N° d'ordre
70

Année scolaire
1954-1955

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean MARQUEVIELLE

LICENCIÉ ÈS SCIENCES NATURELLES
PHARMACIEN
CHEF DE TRAVAUX ET CHARGÉ DE COURS
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à Issoire (Puy-de-Dôme), le 11 Septembre 1926.

1re Thèse. — RECHERCHES SUR LE RÔLE EXERCÉ PAR LES LIPIDES SÉRIQUES DANS LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS.

2e Thèse. — BIOCHIMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA PIGMENTATION CHEZ LES ARTHROPODES.

soutenues le 19 Avril 1955 devant la Commission d'examen

Président..... MM. GENEVOIS, professeur

Examinateurs.. LAFON, professeur
BOUNHIOL, professeur
TAYEAU, professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1957

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547308_0069

N° d'ordre
70

Année scolaire
1954-1955

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean MARQUEVIELLE

LICENCIÉ ÈS SCIENCES NATURELLES
PHARMACIEN
CHEF DE TRAVAUX ET CHARGÉ DE COURS
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à Issoire (Puy-de-Dôme), le 11 Septembre 1926

1re Thèse. — RECHERCHES SUR LE RÔLE EXERCÉ PAR LES LIPIDES SÉRIQUES DANS LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS.

2e Thèse. — BIOCHIMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA PIGMENTATION CHEZ LES ARTHROPODES.

soutenues le 19 Avril 1955 devant la Commission d'examen

Président..... MM. GENEVOIS, professeur

Examinateurs.. LAFON, professeur
BOUNHIOL, professeur
TAYEAU, professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1957

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

MM.

Doyen ..... BRUS

Doyens honoraires..
- PADÉ ..... Recteur honoraire de l'Académie d'Aix
- PICART ..... Membre de l'Institut.
- DUPONT ..... Directeur de l'Ecole Normale Supérieure.
- CHAINE
- MERCIER

Professeurs honoraires .....
- PADÉ ..... Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
- BOUNHIOL
- DEVAUX ..... Membre de l'Institut.
- DUPONT ..... Directeur de l'Ecole Normale Supérieure.
- PICART ..... Membre de l'Institut.
- DAURE ..... Recteur de l'Académie de Caen.
- CHAINE
- KASTLER ..... Professeur à la Sorbonne.
- QUELET..... Professeur à la Sorbonne.

Professeurs .....
- MERCIER..... Radio-électricité.
- MILLOUX..... Calcul infinitésimal.
- DANGEARD..... Botanique.
- GENEVOIS..... Chimie biologique et Physiologie végétale.
- CAU..... Physique expérimentale.
- BRUS..... Chimie.
- AVEL..... Zoologie et Physiologie animale.
- ROUSSET..... Physique générale.
- ROGER..... Mécanique rationnelle.
- WEILL..... Anatomie comparée et Embryogénie.
- SERVANT..... Physique.
- DUFRESNOY..... Mathématiques générales.
- LAFON..... Physiologie générale.
- BOUNHIOL..... Zoologie.
- PISOT..... Calcul des probabilités.
- DAVID..... Biologie végétale.
- GAY..... Minéralogie.
- SCHOELLER..... Géologie.
- CALAS..... Chimie organique.
- GUIZONNIER..... Physique.
- ALLARD..... Chimie.
- LAMARE..... Géologie et Minéralogie.
- COLMEZ..... Mathématiques.
- PATY..... Chimie P. C. B.
- PACAULT..... Chimie physique.
- M^lle^ JOSIEN..... Chimie minérale.
- RIBEREAU-GAYON Œnologie et Chimie agricole.
- CAMBAR..... Biologie générale.
- MALVESIN-FABRE. Anthropologie et Préhistoire.
- VIGNEAUX..... Géologie.

Maître de conférences honoraire.. DE PUYMALY

Maîtres de conférences .....
- SÉCHET..... Botanique.
- JEAN..... Physique théorique.

Secrétaire principal. ARTIGUELONG

A LA CAISSE RÉGIONALE DE SÉCURITÉ SOCIALE

DE BORDEAUX

Nous avons réalisé une partie de nos recherches au CENTRE DE BIOLOGIE PRÉVENTIVE de la Caisse Régionale de Sécurité Sociale; nous y avons trouvé, avec les collaborations les plus aimables et les plus efficaces, les moyens matériels qui nous ont permis de mener à bien la réalisation de certaines de nos expériences.

Nous garderons un excellent souvenir des moments passés au CENTRE DE BIOLOGIE PRÉVENTIVE.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SIGALAS

DOYEN DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

PROFESSEUR DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE

DIRECTEUR HONORAIRE DE LA STATION BIOLOGIQUE D'ARCACHON

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

CHEVALIER DU MÉRITE MARITIME

COMMANDEUR DANS L'ORDRE DE L'ÉTOILE NOIRE

Dont la bienveillance à notre égard
ne s'est jamais démentie.

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE DOYEN L. CHELLE

DOYEN HONORAIRE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
ET DE L'ACADÉMIE DE PHARMACIE

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Sa paternelle amabilité nous a toujours été extrêmement précieuse.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TAYEAU

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
ASSESSEUR DU DOYEN
DOCTEUR ÈS SCIENCES
OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES
MÉDAILLE D'HONNEUR DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE

Nous avons eu la chance de trouver en lui un Maître dont les immenses connaissances, toujours mises à notre disposition avec autant d'amabilité que de simplicité, n'ont d'égales que les plus hautes et les plus rares qualités morales.

Dans le chemin que nous avons jusqu'ici parcouru, il a été à la fois le guide et le soutien. C'est avec émotion que nous lui exprimons aujourd'hui notre profonde gratitude et notre respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. J. BOUNHIOL

PROFESSEUR DE ZOOLOGIE
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX
OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Nous avons été particulièrement sensible à l'excellent accueil qu'il nous a toujours réservé.

Nous l'assurons de notre bien vive et respectueuse gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. LAFON

PROFESSEUR DE PHYSIOLOGIE GÉNÉRALE
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX
OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Qui nous a fait le grand honneur de bien vouloir siéger dans notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. GENEVOIS

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Nous avons conservé un excellent souvenir de son enseignement et nous avons bien souvent bénéficié de sa vaste érudition.

Nous n'oublierons jamais l'amabilité avec laquelle il a bien voulu nous accueillir lorsque nous lui avons apporté notre manuscrit.

Qu'il soit assuré de notre très respectueuse reconnaissance.

RECHERCHES SUR LE RÔLE EXERCÉ PAR LES LIPIDES SÉRIQUES DANS LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS

INTRODUCTION

> « Le seul fait que les physicochimistes abordent aujourd'hui le domaine de l'immunochimie est un symptôme de son état floride, car pour que ces spécialistes aient pu mettre en œuvre leur talent spéculatif, il fallait que les expérimentateurs aient accumulé un grand nombre de mesures correctes. »
>
> Michel Polonovski.

La science de l'immunité a connu pendant de nombreuses années une ère purement empirique; malgré la précision des observations, la multiplication des expériences, le pourquoi des faits restait mystérieux !

Le développement spectaculaire de la biochimie et de la physicochimie allait permettre à l'immunologie d'entrer dans une ère nouvelle et d'expliquer par des lois judicieusement établies de nombreux phénomènes jusque là obscurs.

La découverte classique d'Obermayer et Pick, montrant que la fixation d'un groupement nitré sur un antigène créait une nouvelle spécificité immunologique, renversait le mur sur lequel butaient depuis longtemps les spécialistes de l'immunité et de la sérologie. Dès lors, l'immunologie et la biochimie se trouvaient étroitement liées, les méthodes de l'une devenaient indispensables à l'autre... Il en résulta une véritable science nouvelle, *l'immunochimie*.

Lorsque l'on suit la prodigieuse évolution de l'immuno-

chimie, on ne peut s'empêcher d'établir une comparaison avec l'enzymologie. Réaumur avait montré en 1713 que le suc gastrique de Buse était capable de liquéfier la viande : il fallut néanmoins attendre plus de cent cinquante ans après cette découverte fondamentale pour que l'enzymologie quittât le domaine empirique et que ses premières bases physicochimiques pussent être établies. L'enzymologie entre désormais dans le cadre de la biochimie : le mécanisme de l'activité enzymatique a livré déjà beaucoup de ses secrets.

Les réactions enzymatiques, lorsqu'on y réfléchit bien, présentent d'incontestables analogies avec les réactions immunitaires. Quelques exemples montrent le bien-fondé de cette conception : Wurmser et ses collaborateurs [171] ont prouvé, grâce à des études thermodynamiques, que l'énergie de liaison entre antigène et anticorps est tout à fait comparable à celle qui unit l'enzyme et son substrat.

Certaines substances se combinant à l'anticorps diminuent la vitesse de combinaison avec l'antigène (cas du formol, du cétène, etc...) ; le « blocage » de certaines fonctions de l'enzyme ralentit de même sa combinaison avec le substrat.

Au cours de précédentes recherches [157], nous avons montré que la ninhydrine réduit considérablement l'activité de la papaïne, tandis qu'elle augmente, au contraire, celle de la pepsine. Simultanément, il était démontré, dans le laboratoire où nous travaillons, que ce même réactif, réagissant sur l'anticorps, accélère la combinaison antigène-anticorps de Lapin et ralentit, au contraire, la combinaison antigène-anticorps de Cheval [155]. Suivant l'origine de l'enzyme comme suivant l'origine de l'anticorps, un même réactif peut donc exercer un effet opposé.

Les remarquables progrès réalisés par l'enzymologie et la parenté qui existe entre les réactions enzymatiques et certaines réactions immunologiques nous incitent à appliquer à celles-ci les techniques qui se sont montrées si fécondes pour celles-là.

C'est dans cet esprit que, dès 1945, M. le Professeur Tayeau a abordé toute une série de recherches qui ont consisté à étudier l'effet exercé sur les anticorps par divers réactifs; les résultats obtenus ont fait l'objet d'un certain nombre de thèses (Neuzil [103], Pautrizel [121], M^lle^ Faure [40], M^me^ Capdejelle [16]) et d'exposés (Tayeau et Neuzil [159], Tayeau [150]).

Un point particulier comportait encore de nombreuses

inconnues : le rôle joué dans la précipitation spécifique par les lipides sériques dont l'action semble encore assez mystérieuse. Aussi, HEIDELBERGER [53] écrivait-il tout dernièrement : « further work is indicated before a definite decision can be made as to whether or not the function of lipids is purely mechanical. »

Lorsqu'il y a déjà quelques années nous lui avons demandé un sujet de travail, M. le Professeur TAYEAU nous confia l'étude du rôle exercé par les lipides dans la réaction de précipitation spécifique. A la suite de nos expériences, nous avons été amené à élargir notre sujet et le résultat de nos recherches fait l'objet de la présente thèse.

Après un bref rappel sur les antigènes, les anticorps et la réaction antigène-anticorps (chapitre premier) nous discutons les conceptions modernes sur l'état des lipides du sérum sanguin (chapitre II).

La seconde partie comporte l'exposé de nos recherches expérimentales. Celles-ci débutent par une étude sur le rôle exercé par les lipides sériques dans la réaction de précipitation spécifique (chapitre premier) ; nous mettons en évidence, dans les recherches exposées au chapitre II, la formation de combinaisons antigène-anticorps délipidé; les résultats obtenus dans ces deux premiers chapitres nous permettent d'envisager l'étude de la spécificité de la deuxième phase de la réaction antigène-anticorps (chapitre III). Enfin, nous étudions l'effet exercé par divers réactifs sur la réaction de précipitation spécifique; nos résultats nous conduisent à établir un certain parallélisme entre la réaction antigène-anticorps et la réaction enzyme-substrat (chapitre IV).

Nous ne voudrions pas aborder le détail de nos recherches sans remercier tous ceux qui, par leur compétence ou leurs connaissances techniques, nous ont aidé à mener à bien le travail que nous avions entrepris.

Notre gratitude va tout d'abord à M. le Professeur F. TAYEAU. Dès avant la fin de nos études, son enseignement avait su nous inspirer le goût de la Biochimie et en particulier de l'étude de ces réactions immunochimiques dont il ne manquait jamais de signaler l'importance et l'intérêt et auxquelles il a toujours consacré une très grande part de son activité scientifique. Aussi est-ce tout naturellement vers lui que nous nous sommes dirigé lorsqu'en 1948, nous avons désiré entrer à notre tour dans la voie de la recherche. Il accueillit avec

la plus extrême bienveillance le jeune élève que nous étions alors. Depuis, malgré ses multiples occupations, il n'a jamais ménagé pour nous ni son temps, ni sa peine; ses conseils précieux, sa bienveillante attention nous ont guidé pas à pas jusqu'à ce jour. Nous lui sommes entièrement redevable de notre formation scientifique et notre reconnaissance à son égard est immense. Qu'il veuille bien en trouver ici l'expression et nous permettre de lui dédier ce travail.

L'amitié de M. le Docteur E. Neuzil, Maître de Conférences agrégé, nous a été précieuse tout au long de ces recherches. Nous avons bien souvent mis à contribution la clarté de son esprit, l'étendue et la précision de ses connaissances, la rigueur de son raisonnement. Nous sommes heureux aujourd'hui de lui exprimer notre bien vive gratitude.

M. le Professeur P. Blanquet a mis à notre disposition les ressources de son service pour l'obtention de protéines marquées et la mesure de leur radioactivité. Ses conseils dans ce domaine nous ont toujours été précieux et nous lui en sommes extrêmement reconnaissant.

M. le Professeur R. Pautrizel, M^lle F. Faure, M. R. Jensen se sont toujours intéressés aux questions qui faisaient l'objet de nos travaux. Ils ont su nous suggérer des hypothèses de travail souvent fécondes et ont contribué à l'interprétation de certains de nos résultats. Nous les assurons ici de notre gratitude.

Le personnel technique du service, M^lle J. Laurent, M^me A. Plazy, M^lle D. Duhau, M^lle M. Basset, s'est toujours efforcé de réaliser au mieux avec une grande patience et toute la précision désirable les expériences que nous avons été amené à lui confier et nous l'en remercions.

Nous associerons dans une même reconnaissance tous ceux qui nous ont fourni les matières premières indispensables à nos recherches : l'Institut Pasteur de Paris et tout particulièrement M. le Docteur Lafaille, chef du Service de la Diphtérie, ainsi que le Centre de Biologie Préventive de la Caisse Régionale de Sécurité Sociale, dont M. J. Grouillé dirige avec compétence et autorité les services animaliers.

Enfin, nous ne voudrions pas manquer d'adresser nos sentiments de très vive et respectueuse reconnaissance à notre président de thèse, M. le Professeur Genevois, pour l'amabilité avec laquelle il nous a toujours accueilli.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE HISTORIQUE

CHAPITRE PREMIER

QUELQUES BREFS RAPPELS SUR LES NOTIONS CLASSIQUES D'IMMUNOCHIMIE

Puisque plusieurs ouvrages [10, 73, 13, 67] ou revues générales [87, 90, 150] ont été récemment publiés sur l'immunochimie, nous nous contenterons dans ce chapitre de résumer l'essentiel de nos connaissances et d'exposer les notions nécessaires à la compréhension et à l'interprétation de notre étude expérimentale.

On appelle *antigène* toute substance qui, injectée dans l'organisme, se montre capable de susciter la formation d'*anticorps*.

La présence de ces anticorps dans le sérum sanguin peut être mise en évidence de plusieurs façons, qui dépendent en général de l'antigène utilisé :

1° Si l'on injecte à un Lapin une suspension d'hématies de Mouton, le sérum de cet animal présente, après un certain temps, la propriété de lyser *in vitro* les hématies de Mouton. Les anticorps formés dans l'organisme du Lapin sont des *hémolysines* et la réaction permettant de les mettre en évidence est désignée sous le nom de *réaction d'hémolyse spécifique*.

2° Le Cobaye qui a reçu dans le péritoine des injections de suspensions de vibrions cholériques présente, après un certain laps de temps, un exsudat péritonéal capable de lyser *in vitro* le vibrion cholérique *(réaction de bactériolyse)* : l'animal a élaboré des *bactériolysines*.

3° L'individu convalescent d'une fièvre typhoïde qui a subi une agression par le bacille d'Eberth possède un sérum qui

agglutine *in vitro* le bacille d'Eberth *(réaction d'agglutination spécifique)* ; la présence de bacilles d'Eberth dans son organisme a suscité l'élaboration *d'agglutinines*.

4° Le Lapin, ayant reçu une ou plusieurs injections successives de pseudoglobulines de Cheval, par exemple, voit à la longue son sérum capable de précipiter lorsqu'on le met en présence d'une solution de pseudoglobulines de Cheval *(réaction de précipitation spécifique)* : ce sérum contient des *précipitines*.

Toutes ces réactions sont caractérisées par leur étroite spécificité : l'anticorps ne réagit qu'avec l'antigène qui lui correspond; un antigène du même type, mais provenant d'une autre espèce, ne convient pas.

La réaction de précipitation spécifique est certainement l'une des plus utilisées pour les recherches physicochimiques : elle permet, en effet, de diluer ou de salifier le milieu sans inconvénient majeur; elle présente, en outre, l'immense avantage de ne pas nécessiter l'intervention d'un facteur supplémentaire, *l'alexine*. Aussi est-ce cette réaction que nous avons mise en jeu pour nos recherches expérimentales.

Il importe encore de noter que les étiquettes (hémolysines, agglutinines, précipitines, etc...) mises habituellement sur les anticorps ne préjugent en rien de leur nature. Les anticorps sont tous du même type et ne se distinguent que par leur spécificité (Zinsser [173]), car deux réactions apparemment différentes peuvent très bien ne constituer que deux aspects d'un même phénomène [23].

Après avoir brièvement rappelé les notions classiques sur les antigènes et sur les anticorps, nous nous étendrons un peu plus longuement sur la réaction de précipitation antigène-anticorps et surtout sur certaines théories qui cherchent à expliquer le mécanisme de cette réaction.

I. — LES ANTIGÈNES

La première préoccupation des immunochimistes concernant les antigènes a consisté à résoudre le problème de leur nature. De nombreux antigènes ont ainsi été étudiés : tous présentent un caractère commun, leur nature protéidique; les protéines ont donc été considérées comme les seules substances susceptibles de présenter des propriétés antigéniques. Cette notion s'est trouvée renforcée lorsque l'on a pu prouver que tout réactif ou tout facteur susceptible d'altérer la molécule pro-

téidique faisait disparaître en même temps les propriétés antigéniques.

Quelle pouvait donc être la partie de la molécule responsable de la spécificité ? Les premières recherches dans ce domaine furent réalisées par Obermayer et Pick [109] : ces auteurs constatèrent que le traitement d'une protéine par l'acide nitrique créait une nitroprotéine, jouissant d'une spécificité propre. Le sérum de l'animal, auquel cette nitroprotéine avait été injectée, réagissait parfaitement avec la nitroprotéine, mais relativement peu avec la protéine native. Les groupements $-NO_2$ ainsi fixés sur les noyaux benzéniques de la molécule protéidique étaient donc en mesure de conférer à cette dernière une nouvelle spécificité immunologique.

A la suite de cette découverte, divers essais du même genre furent tentés, mais le nombre de groupements susceptibles d'être fixés sur une molécule de protéine étant fort restreint, la plupart de ces essais n'ont pas toujours apporté les résultats escomptés [voir 87]. Landsteiner [73] résolut ce problème en fixant à la protéine diverses fonctions chimiques par l'intermédiaire d'un groupement diazoïque. Il réalisa ainsi des antigènes partiellement artificiels du type P-D-S, dans lesquels P représente une protéine, D un groupement diazoïque et S un noyau benzénique porteur de fonctions chimiques variées. Landsteiner put ainsi mettre en évidence d'étroites spécificités immunologiques : il montra par exemple que l'animal ayant reçu une injection de P-D-S, dans lequel S est constitué par un dérivé ortho-disubstitué, présente un sérum réagissant bien avec le même antigène, mais ne précipitant plus avec P-D-S', dans lequel S' est également constitué par le dérivé disubstitué, mais du type méta ou para. Bien plus, l'animal « préparé » avec P-D-S dans lequel P est une protéine de Cheval, élabore des anticorps qui réagissent avec P'-D-S dans lequel P' est cette fois une protéine de Porc. La spécificité immunologique se trouve donc liée exclusivement à la structure spatiale de la substance S. La substance S n'est pas capable, injectée à l'animal, de susciter l'apparition d'anticorps; elle est néanmoins susceptible de réagir avec l'anticorps. Une telle substance est désignée sous le nom d'*haptène*. Combinée à une protéine, elle constitue un antigène.

Toutes ces notions ont été considérées pendant quelque temps comme ayant un caractère spéculatif : on pouvait se demander, en effet, si de tels « antigènes artificiels » allaient présenter un rapport avec les antigènes naturels.

La mise en évidence d'haptènes naturels allait permettre de répondre affirmativement à cette question. Heidelberger et Avery [54] ont, en effet, isolé de la capsule du Pneumocoque III une substance capable de réagir avec l'immunsérum homologue et, une fois combinée à une protéine, de conférer par injection l'immunité à la Souris, en suscitant chez cet animal l'élaboration d'anticorps. Il s'agit donc bien d'un haptène, dont la structure a pu être élucidée : il est formé par un polyholoside constitué de molécules de β-glucose et d'acide glycuronique. Par la suite, d'autres haptènes voisins ont été étudiés; parmi eux, signalons ceux des pneumocoques I, II et XIV [56], ceux du charbon [165], ceux des bacilles de Friedlander, etc...; plus tard, des haptènes d'autre nature ont pu être mis en évidence : haptènes protidiques (Ivanovics [66]) et lipidiques (Machebœuf, Lévy et Faure [91]).

Le problème des antigènes semblait donc résolu et l'on pouvait conclure, à la suite des travaux précités, que l'antigène est une protéine dont la spécificité se trouve liée à une substance fixée sur elle, l'haptène; lorsque la substance n'a pu être mise en évidence, ce qui est le cas pour beaucoup d'antigènes, on estime qu'il existe néanmoins une « portion hapténique », représentée par un ensemble de fonctions, auquel on donne le nom de « *groupement déterminant* ».

La découverte d'antigènes glucido-lipidiques (Morgan [102], Boivin [7]) et polyholosidiques (Avery [5]), devait amener une révision des conceptions classiques. Il convient de noter, cependant, que les antigènes non protéidiques sont constitués par de grosses molécules, condition semblant nécessaire à la qualité antigénique.

Cette notion, considérée maintenant comme classique, est, elle aussi, mise en doute par certains : Loiseleur [80] est en effet parvenu à démontrer que certaines substances présentant un petit poids moléculaire, comme le salicylate de sodium, la streptomycine, le saccharose, par exemple, pouvaient se conduire comme des antigènes. Les anticorps correspondants ne peuvent pas être mis en évidence dans tous les cas par les techniques classiques (floculation) : on ne peut les déceler que par une technique beaucoup plus sensible, la viscosimétrie [75].

Il importe de noter que, dans ces conditions, l'élaboration d'anticorps demande une véritable « saturation » de l'organisme animal par l'antigène; aussi certains auteurs adoptent-

ils une attitude réservée, non vis-à-vis des expériences de Loiseleur, mais en ce qui concerne leur interprétation.

Concluons donc que la plupart des antigènes sont, sinon protéidiques, tout au moins constitués par de grosses molécules, dont la spécificité doit être rattachée à la présence du groupement déterminant.

II. — LES ANTICORPS

La nature des anticorps a été déterminée lorsque l'on s'est aperçu que tous les réactifs et tous les facteurs lésant les protéines faisaient disparaître les propriétés anticorps [voir 90].

Des études mettant en œuvre les techniques de relargage [20] ont permis de préciser la nature globulinique des anticorps : parfois, les anticorps sont supportés par la fraction *euglobulines* (cas des anticorps antimicrobiens) ; dans d'autres cas, ils précipitent avec les *pseudoglobulines* (cas des anticorps antitoxiniens et en particulier des anticorps antidiphtériques de Cheval) ; on sait le parti que des instituts sérothérapiques ont tiré de cette constatation qui les a conduits à la préparation d'immunsérums dits « purifiés », dans lesquels ont été éliminées toutes les fractions protéidiques ne supportant pas d'anticorps.

L'utilisation de l'ultrafiltration, de l'ultracentrifugation et de l'électrophorèse a permis d'apporter encore de nouvelles précisions et de constater que les anticorps sont le plus souvent des γ-globulines [162]. Quelle différence peut-il donc exister entre les γ-globulines immunes et les γ-globulines d'un sérum ordinaire ? De nombreuses recherches physicochimiques ont été réalisées pour répondre à cette question; elles n'ont pas abouti, les deux γ-globulines se conduisant exactement de la même façon; seule la technique immunologique, par précipitation spécifique par exemple, permet de les différencier. Il faut donc admettre que la γ-globuline immune possède le sceau, la marque de sa spécificité. Cette caractéristique a été désignée par le nom de « *motif spécifique* ».

Il ne semble pas que le motif spécifique soit réparti uniformément sur toute la molécule de γ-globuline-anticorps; il paraît plutôt localisé : la protéolyse trypsique, à condition de ne pas atteindre un taux trop avancé, permet de diminuer de vingt fois environ le poids moléculaire de l'anticorps tout

en augmentant ses propriétés immunologiques (Northrop [107]). Il semblerait même que le motif spécifique soit particulièrement résistant à l'hydrolyse enzymatique.

Sur l'origine et le lieu de formation des anticorps, de multiples recherches ont été réalisées. Cette question ayant été remarquablement exposée dans une récente revue [89], nous ne ferons qu'en rappeler l'essentiel : lorsque les antigènes pénètrent dans l'organisme, ils se trouvent captés par les cellules du système réticulo-endothélial; là, ils subissent une modification dont la nature nous échappe encore (Ehrich et Harris [36]) ; ces antigènes « modifiés » libérés dans la circulation sont alors captés par les lymphocytes ou par les plasmocytes, cellules chargées normalement d'élaborer les γ-globulines (Dougherty, White et Chase [32], Fagraeus [39]) ; à partir de ce moment, les nouvelles γ-globulines formées sont marquées de l'empreinte de l'antigène et constituent les anticorps correspondants. Le mécanisme de formation de cette empreinte peut s'expliquer à l'aide des « modèles » réalisés par Pauling et Campbell [116] : ces auteurs mettent en présence une γ-globuline et du bleu de méthyle. Le mélange est amené lentement et graduellement à *p*H 10 : dans ces conditions, la molécule de protéine, telle un livre, s'ouvre en deux feuillets; il est ramené ensuite au *p*H primitif, ce qui permet à la protéine de reprendre sa forme initiale; il est alors dialysé (élimination des sels et du bleu de méthyle). A la suite de ce traitement, la protéine a pris l'empreinte du bleu de méthyle et se conduit dès lors vis-à-vis de ce colorant comme un anticorps : il suffit, en effet, de les mettre en présence pour obtenir un floculat. Des essais du même type ont pu être effectués avec des antigènes naturels.

Le processus de libération des anticorps dans le sang se trouve soumis à des corrélations neuro-hormonales, dans lesquelles l'A. C. T. H. et les hormones surrénales jouent le rôle essentiel (Dougherty, Chase et White [32]).

III. — LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Cette réaction, décrite pour la première fois en 1897 par Kraus [70], comporte, selon Bordet [9], deux phases distinctes :

1° L'union des molécules d'antigène et d'anticorps, au cours

de laquelle s'effectue la combinaison entre le groupement déterminant de l'un et le motif spécifique de l'autre. Cette première phase est très rapide.

2° L'apparition du précipité — du floculat comme on le désigne encore — qui est beaucoup plus tardive.

a) *Première phase.* — L'union entre l'antigène et l'anticorps peut mettre en œuvre, selon Pauling [voir 73], deux types de liaisons, des liaisons énergétiquement fortes et des liaisons énergétiquement faibles.

Les premières seraient surtout représentées par des liaisons électrovalentielles : les travaux de Landsteiner, auxquels nous avons fait précédemment allusion, montrent la possibilité d'existence de telles liaisons.

Loiseleur [78] a pu apporter un argument en faveur d'une telle conception : mettant en œuvre, comme antigène, le venin de Cobra, cet auteur est parvenu à inverser le signe des divers groupements positifs et négatifs de la molécule par une technique d'électrodialyse (*) : il a ainsi obtenu ce qu'il appelle un *contre-antigène,* qui constitue la « réplique électrique de l'antigène »; or, le contre-antigène se conduit comme un anticorps vis-à-vis de l'antigène qui lui a donné naissance (floculation). Dans cet exemple, il faut admettre que la combinaison antigène-contre-antigène est due à une union ionique.

En dépit de ces expériences séduisantes, il semble difficile d'admettre que l'union entre antigène et anticorps naturels soit due à de telles liaisons. On a pu montrer en effet qu'au cours de la combinaison antigène-anticorps il n'apparaît aucune modification de charge électrique (Viscontini [167]), comme cela devrait se produire si l'on avait affaire à une liaison ionique. Nous-même avons prouvé, grâce à des mesures mettant en œuvre la diffusion latérale de la lumière, que le « blocage » des fonctions basiques de l'anticorps n'empêchait nullement la combinaison entre l'antigène et l'anticorps.

(*) Le traitement de la protéine par le sulfate de cuivre dans certaines conditions transforme les groupements $-C\begin{matrix}O\\ \\O^-\end{matrix}$ en $-C\begin{matrix}O\\ \\O-Cu^+\end{matrix}$

L'action du sulfure de carbone modifie les groupes basiques :

$$-NH_3^+ \longrightarrow -N\begin{matrix}S^-\\ \\H\end{matrix}=C=S$$

Enfin, les récents travaux réalisés par Wurmser et ses collaborateurs [171], fondés sur l'énergie de liaison entre l'antigène et l'anticorps, plaident plutôt en faveur d'une liaison énergétiquement faible.

Les forces intermoléculaires faibles comprennent surtout les liaisons de Van der Waals (attraction électronique entre les atomes d'une molécule et ceux de la molécule voisine) et les liaisons hydrogène. Ces deux types de liaison pourraient intervenir et le groupement déterminant serait constitué par un ensemble défini d'attractions. La notion d'organisation de ces attractions se trouve prouvée par une élégante expérience de Danielli, Danielli et Marrack [22] : ces auteurs ont montré que l'étalement en surface d'une protéine, qui détruit la position relative des divers groupements ou attractions, fait perdre à cette protéine ses propriétés spécifiques.

L'existence de forces intermoléculaires faibles, de « forces à distance » comme on les a désignées parfois, a fait l'objet de diverses recherches : Röthen [132] a prouvé qu'une lame mince d'antigène était capable de réagir avec une lame d'anticorps à travers une lame inerte, constituée par du formvar ou du stéarate de baryum par exemple. Cette expérience de Röthen a été vivement critiquée [voir 150]; cependant, l'existence de liaisons énergétiquement faibles dans le complexe antigène-anticorps apparaît très probable : selon Wurmser et ses collaborateurs [171], l'union entre l'agglutinine et l'agglutinogène correspondrait à la formation d'environ 4 liaisons hydrogène ou 20 attractions de Van der Waals par molécule d'agglutinine; selon Moralès, Botts et Hill [101], la combinaison d'une molécule d'hémocyanine avec l'anticorps correspondant impliquerait la mise en œuvre de 8 liaisons hydrogène. Mentionnons enfin pour mémoire les travaux de Haurowitz et collaborateurs [50, 51] dont les conclusions rejoignent les précédentes. Ces diverses constatations doivent-elles éliminer l'intervention éventuelle des liaisons énergétiquement fortes ? Il semble que non et très probablement les deux types de forces doivent intervenir (Pressman, Bryden et Pauling [129]).

De toutes façons et quelle que soit la nature des liaisons, la combinaison entre l'antigène et l'anticorps s'effectue très rapidement comme le prouvent diverses expériences mettant en jeu la viscosité (Lecomte du Noüy [74], Lumière et Meyer [83], Coppo [21], Loiseleur et M^lle^ Lévy [81]), la réfractométrie (Loiseleur et M^lle^ Lévy [81]) et la diffusion latérale

de la lumière (Gitlin et Edelhoch [44], Goldberg et Campbell [45]).

b) *Seconde phase.* — Le précipité qui apparaît plus ou moins longtemps après la combinaison antigène-anticorps est constitué par ces deux substances (von Dungern [voir 103]).

L'apparition du précipité ne se produit seulement que pour certaines proportions relatives entre l'antigène et l'anticorps : si l'on ajoute, en effet, à des volumes identiques d'anticorps des quantités croissantes d'antigène et si l'on place les différents mélanges à 37° C, on constate que les précipités n'apparaissent seulement que dans certains tubes : il ne se produit pas de précipité lorsqu'il y a excès d'antigène ou excès d'anticorps (zone d'inhibition de Heidelberger). Cette constatation, dite « phénomène de zone », permet de tracer la courbe représentative des variations de l'abondance du précipité (déterminé par sa teneur en azote) en fonction de la concentration relative entre l'antigène et l'anticorps : le plus souvent cette courbe passe par un maximum (Heidelberger). Ce maximum correspond à la neutralisation exacte de l'antigène par l'anticorps. On peut encore substituer à l'évaluation de l'importance des précipités leur vitesse d'apparition; cette donnée, qui reflète l'*avidité* des anticorps [voir 150], se montre proportionnelle à l'abondance du précipité : le précipité le plus abondant est généralement celui qui apparaît le premier. On sait tout le parti que l'on a pu tirer de cette constatation pour la titration des anticorps (technique de Ramon [131], technique de Dean et Webb [24]) (*).

La vitesse d'apparition du précipité spécifique dépend de plusieurs facteurs (présence de sels minéraux, *p*H, température, pression, présence de substances étrangères [voir 150]). Ces faits montrent la nécessité d'opérer dans des conditions rigoureuses lorsque l'on veut effectuer des mesures comparatives.

(*) La technique de Ramon, la plus ancienne en date, consiste à ajouter à une même quantité de toxine de titre connu des quantités décroissantes de sérum antitoxique. Après agitation, les mélanges sont placés à 37° C. La première floculation qui apparaît, ou « primo-floculation », fait connaître la valeur antitoxique de l'immunsérum.

Contrairement à la précédente, la technique de Dean et Webb met en œuvre des quantités constantes d'anticorps et des volumes égaux de solution d'antigène de titre décroissant.

La technique de titration à anticorps constant est parfois appelée α titration, la floculation à antigène constant étant alors désignée du nom de β titration [voir 97, 103].

IV. — THÉORIES SUR LE MODE D'UNION ENTRE L'ANTIGÈNE ET L'ANTICORPS

On trouvera un exposé détaillé de ces théories dans divers ouvrages [10, 13, 103, 150]. Aussi, ne ferons-nous que mentionner l'essentiel en insistant sur les points particuliers susceptibles d'éclairer l'interprétation de nos expériences.

Théorie d'Ehrlich [37]. — Cette théorie, la plus ancienne, considère que la réaction antigène-anticorps est absolument comparable à la neutralisation d'un acide fort par une base forte. Cette conception se trouve infirmée par diverses constatations : le mélange de 100 doses toxiques et de 99 doses antitoxiques est absolument inoffensif; or, selon Ehrlich, il devrait contenir encore une dose toxique ! Cette théorie admet la fixité de composition du complexe antigène-anticorps; or, l'expérience montre que l'antigène et l'anticorps peuvent s'unir dans des proportions variables.

Théorie d'Arrhenius-Madsen [4]. — Ces auteurs estiment que la réaction antigène-anticorps est régie par la loi de Guldberg et Waage et que la neutralisation de l'antigène par l'anticorps est tout à fait comparable à la neutralisation d'une base, comme l'ammoniaque, par un acide faible, comme l'acide borique.

Cette conception fut critiquée par Bordet [10] : si, en effet, la loi d'action de masse régit la combinaison antigène-anticorps, le mélange de ces deux substances, même à l'optimum, doit toujours comporter des molécules d'antigène à l'état libre; si donc, on injecte à un Cobaye le mélange exactement neutralisé de toxine diphtérique et d'antitoxine correspondante, des phénomènes toxiques devraient apparaître. On sait, en effet, la facilité avec laquelle les cellules fixent la toxine libre; la fixation de cette dernière devrait donc détruire l'équilibre et amener la libération d'une nouvelle quantité de toxine fixée à son tour, ...si bien que finalement toute la toxine devrait être fixée par l'animal ! Or, un tel mélange, on le sait, est absolument inoffensif.

Cette théorie, qui, comme la précédente, conduit à admettre qu'antigène et anticorps se combinent selon un rapport unique et immuable est donc contraire à la réalité.

Théorie de Bordet [10]. — C'est à la suite de travaux ayant montré que l'antigène et l'anticorps pouvaient s'unir en proportions variables que Bordet s'est trouvé amené à échafauder sa théorie.

Bordet considère qu'il existe un étroit parallélisme entre la réaction antigène-anticorps et les réactions dites « colloïdales » : la présence d'électrolytes est nécessaire pour l'une comme pour les autres; la neutralisation de l'antigène par l'anticorps qui dépend des conditions expérimentales (phénomène de Bordet-Danysz) se retrouve, par exemple, dans la neutralisation de l'anhydride arsénieux par l'hydrate de fer colloïdal (phénomène de Biltz).

La réaction de précipitation spécifique correspondrait donc à l'adsorption d'une couche d'anticorps à la surface de l'antigène. Suivant les proportions relatives des deux constituants, cette surface pourrait être plus ou moins occupée : on aurait donc suivant ces proportions divers produits de transition, dont chacun aurait une composition et des qualités propres. Cette fixation de l'anticorps sur l'antigène correspond à la première phase de la réaction. C'est alors qu'interviendraient les forces de cohésion tendant à rapprocher les uns des autres les complexes formés : « l'affinité mutuelle prend le dessus et se substituerait à l'affinité pour l'eau » (Bordet [10]). Les complexes ainsi assemblés s'insolubilisent et précipitent. C'est alors que la seconde phase apparaît.

Diverses expériences ou arguments plaident en faveur de cette théorie. Anderson et Stanley [3] ont pu montrer, grâce au microscope électronique, que les anticorps adsorbés par une molécule de virus de la mosaïque du tabac forment une couche ayant une épaisseur de 225 Å; or, cette dimension correspond justement à la longueur de la molécule de γ-globuline-anticorps.

Le phénomène de zone et l'inhibition de ce phénomène en présence d'un excès d'antigène ou d'anticorps s'expliquent également : lorsque l'on se trouve en présence d'un excès d'antigène par exemple, les molécules d'anticorps s'éparpillent sur les molécules d'antigène; le faible rapport anticorps/antigène ne suffit plus à diminuer suffisamment les forces d'affinité pour l'eau, et les forces de cohésion, auxquelles nous faisions précédemment allusion, ne pouvant plus « prendre le dessus », la floculation ne se produit plus.

L'une des données essentielles de la théorie de Bordet, point sur lequel nous allons revenir longuement dans la partie

expérimentale de notre travail, est l'absence de spécificité de la seconde phase. Pour Bordet, la première phase (combinaison de l'antigène avec l'anticorps) est seule spécifique; la seconde phase, la seule visible, ne fait pas intervenir du tout les forces spécifiques et constitue un phénomène purement physicochimique en tous points comparable à la « floculation des colloïdes ».

Un certain nombre de travaux sur lesquels nous aurons l'occasion d'insister plaident en faveur de cette conception : l'action de certains réactifs chimiques (formol, cétène, monobromacétate de sodium, phényl*iso*cyanate, ninhydrine, etc...) n'empêche pas la combinaison antigène-anticorps, mais agit sur la deuxième phase de la réaction en retardant le plus souvent ou parfois en avançant la précipitation spécifique.

Théorie de Marrack [97]. — La théorie de Bordet présente sur les précédentes l'avantage de pouvoir expliquer l'union antigène-anticorps en proportions variables; elle ne renseigne pas cependant sur le nombre des groupements déterminants ou des motifs spécifiques susceptibles d'entrer en jeu. Cette remarque a conduit à la notion de *valence immunologique,* celle-ci étant caractérisée par le nombre de groupements déterminants ou de motifs spécifiques par molécule considérée.

En ce qui concerne l'antigène, l'unanimité est faite : les antigènes sont polyvalents. Divers arguments plaident en faveur de cette polyvalence : pour qu'un antigène du type Landsteiner puisse se combiner avec l'anticorps correspondant, il est indispensable qu'il contienne, par molécule, un nombre minimum de groupements hapténiques [61]; la périodicité qui existe en ce qui concerne certains aminoacides au sein de la molécule protéidique laisse penser que cette périodicité existe également pour les groupements déterminants. Enfin, des études quantitatives ont montré qu'une molécule d'antigène peut se combiner à un grand nombre de molécules d'anticorps [63].

Les opinions divergent sur la valence de l'anticorps : certains auteurs (Marrack, Heidelberger, Hershey, Dervichian et Grabar) les reconnaissent polyvalents, d'autres (Pauling) bivalents, d'autres enfin (Wormall) monovalents [voir 150].

Marrack considère que l'antigène et l'anticorps s'unissent en une véritable mosaïque formant un réseau (fig. 1 B) *(lattice theory)*. Dans ce réseau, de nombreuses fonctions polaires des molécules protéidiques se trouvent engagées;

seules « émergent » les fonctions placées à la périphérie de l'agrégat. La solubilité du réseau ainsi formé se trouve conditionnée par le rapport $\frac{\text{fonctions polaires restées libres}}{\text{volume de l'agrégat}}$.

Au fur et à mesure que s'édifie le réseau, des fonctions polaires de chaque molécule « intégrée » disparaissent, tandis que le volume de l'agrégat augmente; la valeur du rapport diminue donc continuellement et lorsqu'elle atteint un certain taux l'insolubilisation se produit.

En dehors de la zone d'équivalence (fig. 1 B), on pourra observer des agrégats du type 1 A (excès d'anticorps) ou 1 C (excès d'antigène) ; dans ces derniers agrégats, le rapport reste élevé, ce qui explique l'absence de précipitation.

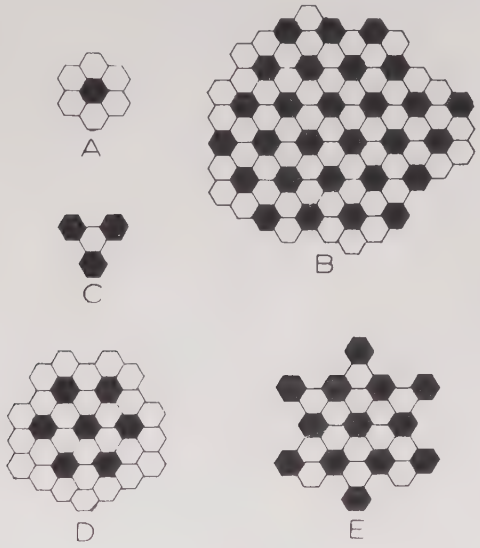

Fig. 1.

Constitution de complexes spécifiques (d'après Marrack).

A, grand excès d'anticorps; B, zone d'équivalence; C, grand excès d'antigène; D, excès d'anticorps; E, excès d'antigène.
En foncé : antigène; en clair : anticorps.

Cette théorie se distingue nettement de la théorie de Bordet : elle n'admet pas l'intervention de forces non spécifiques dans le second temps de la réaction : ici les forces spécifiques interviennent jusqu'au terme de la réaction. La

deuxième phase constitue le prolongement obligatoire de la première.

Théorie de Heidelberger [52]. — Selon cet auteur, la réaction antigène-anticorps constitue une série de réactions bimoléculaires successives. La loi d'action de masse intervient continuellement et la quantité de complexe formé dépend de la concentration de l'antigène et de l'anticorps. On trouvera dans l'important ouvrage de Boyd [13] et dans la thèse de Neuzil [103] un exposé détaillé sur cette théorie et sur son expression mathématique. Des expériences réalisées par Schramm et Friedrich-Freksa [136] apportent d'intéressants arguments en faveur de cette théorie, qui rejoint par de nombreux points celle de Marrack.

Théorie de Dervichian et Grabar [31]. — Cette théorie, voisine des deux précédentes, est fondée sur les conceptions de Dervichian [29] concernant la structure des protéines; ces conceptions se sont trouvées plus tard incompatibles avec certains points de la structure des protéines, révélés par les diagrammes de diffraction des rayons X (Astbury).

Théorie de Pauling [116]. — Cette théorie rejoint pour une grande part celle de Marrack : elle montre qu'il suffit de considérer l'anticorps comme bivalent pour expliquer les phénomènes observés et repose sur une très élégante expérience réalisée par Pauling, Pressman et Campbell [117] : ces auteurs injectent à des lapins une azoprotéine, de groupe hapténique R (*p*-azobenzène-arsinate) : ils obtiennent ainsi un sérum anti-R. Par ailleurs, ils injectent à d'autres lapins une autre azoprotéine, de groupe hapténique X (*p*-azobenzoate) : cela leur permet d'obtenir un sérum anti-X. Ils préparent ensuite une substance synthétique R — X (di-haptène) comprenant à la fois les deux substances R et X. Or, RX est incapable de floculer avec l'un ou l'autre immunsérum, mais donne en revanche un floculat avec le mélange des deux immunsérums. Seul le mélange des deux immunsérums peut donner naissance à des agrégats suffisamment gros pour entraîner la floculation. La figure 2 a, b, c, dans laquelle l'anticorps A est bivalent, concrétise les conceptions de Pauling.

RX - A - XR	XR - A - RX	- RX - A - XR - A - RX - A - XR - A -
(X)	(R)	(X) (R) (X) (R)
(a)	(b)	(c)

Fig. 2.

Les figures 3 et 4 correspondent aux schémas proposés par Pauling [116].

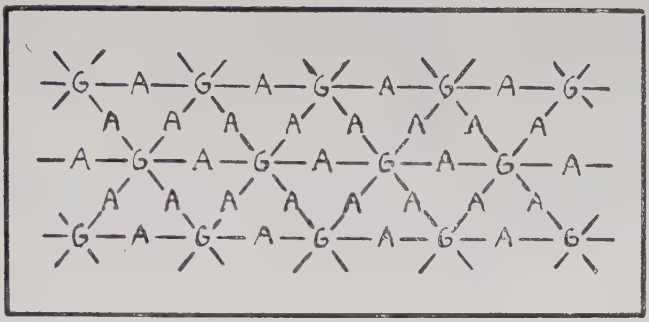

Fig. 3.

Combinaison antigène-anticorps
dans la zone des proportions optima (d'après Pauling).
(L'antigène a ici la valence 12; six valences sont représentées dans le plan de la figure, trois relient cette couche à l'assise supérieure analogue, trois à l'assise inférieure.)

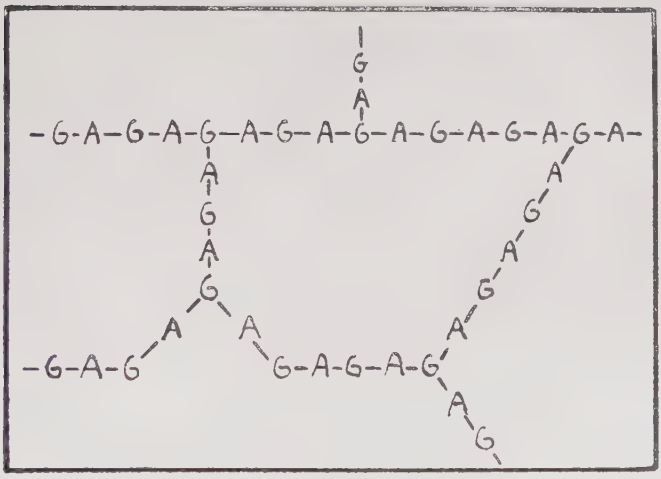

Fig. 4.

Combinaison antigène-anticorps
dans la région d'excès d'antigène (d'après Pauling).

Plusieurs auteurs (Pappenheimer, Lundgren et Williams [115], Eisen et Karush [38] et même Marrack et Hoch [99]) ont apporté des arguments en faveur de la bivalence des anticorps.

Théorie de Wormall et coll. [6]. — Le dosage des constituants du précipité antigène-anticorps avait montré que, dans certains systèmes, on pouvait avoir affaire à des anticorps monovalents : système ovalbumine-antisérum de Lapin (Heidelberger et Pedersen [58]); systèmes agglutinants rickettsia-antisérum de Lapin, rickettsia-antisérum humain de convalescent (Winkler et Westphal [170]). La mise en jeu par Banks, Francis, Mulligan et Wormall [6] d'antigènes et d'anticorps marqués par des éléments isotopiques plaide en faveur de la monovalence des anticorps.

De ces diverses théories sur la combinaison antigène-anticorps, il est à l'heure actuelle difficile de conclure; toutes présentent une certaine part de vérité. Par ailleurs, il n'est pas impossible que l'on obtienne des résultats variés suivant le système envisagé; peut-être n'existe-t-il pas de loi générale ?

De plus, ces théories font toutes intervenir le motif spécifique de l'anticorps dont on ignore toujours la nature. Aussi, tant que nous ne serons pas mieux fixés sur la structure fine des protéines globulaires, il faudra sans doute se contenter de ces diverses théories.

CHAPITRE II

L'ÉTAT DES LIPIDES DANS LE SÉRUM SANGUIN

La plupart des travaux exposés dans la partie expérimentale de notre travail portent sur l'influence exercée par les lipides sériques sur les phénomènes immunitaires. Ces travaux ne sauraient être interprétés sans que soient présentes à l'esprit les notions concernant l'état des lipides dans le sérum sanguin.

Le sérum, liquide aqueux, contient, malgré sa limpidité, 5 à 10 g de substances lipidiques par litre. Ces substances se trouvent constituées par des glycérides, des phospholipides, des stérides et des stérols.

Pour expliquer le maintien des lipides dans la phase aqueuse que constitue le sérum, diverses raisons ont été invoquées : alcalinité du sang (Thudicum [161]), présence de sels biliaires (Long et Gephart [82]) ou d'amines cycliques (Villaret, Justin-Besançon et Drilhon [166]) ; or, le sang est pratiquement neutre (*p*H 7,35) ; de plus, il ne contient normalement pas de sels biliaires, ni d'amines cycliques.

En montrant que les protéines étaient responsables du masquage des lipides cellulaires (Biedermann, Mieschер, Ciaccio), les histologistes ont amené les biochimistes à incriminer les protéines dans le maintien des lipides sériques en phase aqueuse.

I. — LES CÉNAPSES LIPIDO-PROTÉIDIQUES

Ce n'est que beaucoup plus tard que fut démontré le bien-fondé de cette conception : en 1928, Machebœuf [85] isola du sérum sanguin de Cheval une fraction protéidique qui, malgré les purifications qu'on lui fait subir, conserve toujours

la même composition et les mêmes propriétés; cette fraction, qui renferme 40 p. 100 de lipides, est très soluble dans l'eau et sa solution, agitée avec de l'éther, ne livre pas ses lipides à ce solvant. Donc, pour la première fois, des associations lipido-protéidiques étaient isolées. A ces associations, Machebœuf [86] a donné le nom de *cénapses,* qui ne préjuge en rien du mode de liaison unissant les constituants.

Dès le début et même bien avant que les premières cénapses aient pu être isolées, des hypothèses avaient été émises sur le mode d'union éventuel entre lipides et protéines : des liaisons de type ionique ont été invoquées (Dormeyer, Erlandsen [voir 86]); par la suite Sœrensen [140], infirma cette conception, en raison de la rupture possible de ces liaisons par l'alcool.

Machebœuf et Sandor [94] cherchent alors à préciser la nature des liaisons unissant les lipides aux protéines. Après avoir constaté que l'éther additionné de faibles quantités d'alcool (6 p. 100 environ) s'avère capable d'extraire du sérum une appréciable quantité de lipides variés, Machebœuf et Sandor échafaudent une théorie : ils estiment que les lipides et les protéines sont unis entre eux grâce à l'affinité que présentent leurs chaînes polyméthyléniques homologues; de telles chaînes existent en effet aussi bien dans les molécules de protéines (chaînes de leucine, valine, lysine, etc...) que dans celles de lipides (acides gras des phospholipides ou des glycérides, chaîne de l'*iso*-octane du cholestérol, etc...). Les quelques groupements polaires que contiennent les lipides s'orientent alors à la périphérie de la molécule, à côté des fonctions polaires appartenant à la protéine. Ces diverses fonctions créent une « ambiance aqueuse et ionique contrainte » expliquant le masquage des lipides [voir 88]. L'alcool qui diminue cette ambiance pénètre dans l'association et permet l'extraction des lipides par l'éther.

Un argument a pu être apporté en faveur de cette conception : Machebœuf et Tayeau [95] ont, en effet, montré que les savons alcalins, substances hydrosolubles et constituées par des chaînes polyméthyléniques, possèdent la propriété de déplacer les lipides sériques et de prendre leur place en formant de nouvelles cénapses protéines-savon : si l'on agite avec de l'éther du sérum additionné d'une quantité convenable d'un savon alcalin, ce solvant extrait une importante quantité de lipides constitués de glycérides, phosphatides, stérides et cholestérol.

A la suite de ces travaux, on admet donc que toutes les substances lipidiques, quelles qu'elles soient, sont directement fixées sur les protéines par des forces du type Van der Waals.

De nouvelles recherches viennent apporter quelques aménagements à cette première hypothèse : Tayeau [144] montre que certains saponosides, et en particulier celui extrait de *Sapindus mukorosi* dont la structure présente une nette parenté avec celle du cholestérol, possède la propriété, en présence d'éther, de « décoller » électivement et quantitativement le cholestérol sérique. Le fait qu'il soit possible de « décoller » le cholestérol sans déplacer les phosphatides, mais qu'il s'avère impossible d'enlever les phosphatides sans entraîner le cholestérol conduit Tayeau [146] à admettre que les phospholipides constituent le trait d'union entre les protéines et le cholestérol. Cet alcool ne serait donc pas fixé sur les protéines, mais en réalité sur les phosphatides. Par la suite, d'autres substances se sont révélées capables, en présence d'éther, de décoller le cholestérol sinon quantitativement, du moins électivement : citons le dihydroabiétate de sodium [92] et les saponiums [126] ; ces derniers, selon Polonovski [125], pourraient se présenter stériquement sous l'aspect polycyclique des stérols. Toutes ces constatations relèvent de la notion *d'icélomorphisme* (Machebœuf [88]).

Tous ces résultats conduisent à admettre que seules des forces énergétiquement faibles — et des forces de Van der Waals en particulier — interviennent dans l'union protéines-lipides.

II. — CONCEPTIONS RÉCENTES SUR LES ASSOCIATIONS LIPIDO-PROTÉIDIQUES

La découverte des substances superficiellement actives synthétiques allait renouveler les conceptions sur les associations lipido-protéidiques. La préparation d'associations artificielles de structure connue (grâce à l'emploi de détergents synthétiques) a permis de les comparer aux associations naturelles. En travaillant de proche en proche, on a pu démontrer que des associations artificielles protéines-lécithines, dans lesquelles les deux constituants se trouvent unis par des liaisons ioniques, se comportaient absolument comme des associations naturelles. Il fallut donc admettre, contrairement aux premières conceptions, que la liaison unissant les protéines et les

lécithines était une liaison ionique. L'ionisation des protéines sériques fit même penser que cette liaison intéressait les fonctions acides de la protéine et les groupes ammonium quaternaire des lécithines (Chargaff [18]).

La préparation et l'examen d'associations lipides-lipides allaient permettre de résoudre le cas des autres lipides. Diverses associations artificielles lipides-lipides se conduisent de la même façon que celles du sérum [voir 151]. Or, ces associations sont constituées de doubles couches de lipides, séparées par des couches de plusieurs molécules d'eau; dans chaque couche de lipides, les molécules se trouvent côte à côte, leurs groupements polaires étant orientés vers l'eau et leurs chaînes aliphatiques faisant face à celles de la couche voisine (Dervichian [30]).

Dervichian conclut de ses études que les micelles lipidiques, dans lesquelles les divers lipides sont unis par des forces de Van der Waals, sont fixées par des liaisons ioniques à la molécule de protéine. Selon cet auteur, l'union ionique serait faite, en réalité, aux dépens des fonctions basiques de la protéine ($— NH_2$) et des groupements acides (phosphorique) des lécithines.

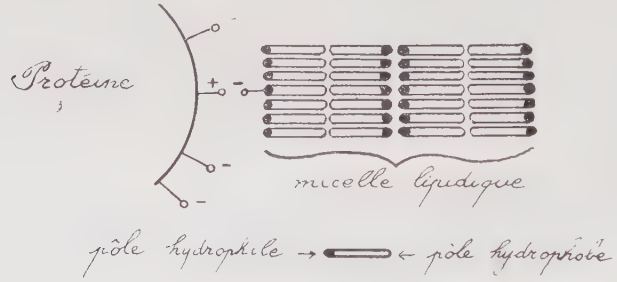

Fig. 5.

Modèle d'association lipido-protéidique.

On s'explique ainsi que les savons naturels (anioniques) puissent se substituer aux lécithines et « décoller » par ce moyen tous les lipides sériques; on comprend également que les saponosides ou les saponiums n'agissent que sur le cholestérol seulement.

Schwert, Putnam et Briggs [137] ont enfin montré, à l'aide d'études mettant en œuvre des associations artificielles, que l'existence d'une liaison ionique protéine-lécithine n'est

pas incompatible avec la migration globale des associations lipido-protéidiques dans un champ électrique (électrophorèse).

Il est possible que toutes les cénapses du sérum sanguin ne répondent pas à ce type; il semble, par exemple, que dans les cénapses acidoprécipitables, l'union ne se fasse pas par des forces ioniques (Gorter et Hermans [46], Tayeau [145]); par ailleurs, on a pu isoler des cénapses lipido-peptidiques (Tayeau et Breton [152]) et lécithines-aminoacides (Polonovski et coll. [133]). Ces dernières cénapses ne représentent cependant qu'une faible portion des lipoprotéines.

Ces notions sur la structure des associations lipido-protéidiques du sérum sanguin nous aideront à concevoir le rôle important joué par les diverses substances lipidiques dans la réaction de précipitation spécifique.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

CHAPITRE PREMIER

LES LIPIDES SÉRIQUES ET LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE

Nous avons rappelé, dans notre étude historique, que les substances lipidiques du sérum se trouvent associées aux protéines; aussi, lorsque l'on précipite ces dernières au sein de leur solution, les lipides se trouvent-ils entraînés avec elles. Les anticorps qui, nous l'avons vu, sont des γ-globulines, n'échappent pas à cette règle générale et les protéines-anticorps, même purifiées, contiennent toujours des substances lipidiques (Chow et Goebel [19]).

Ces substances, que l'on retrouve d'ailleurs dans les précipités antigène-anticorps [15, 42], interviennent dans la solubilité des associations dont elles font partie. Le phénomène de précipitation spécifique consistant en un phénomène d'insolubilisation, on conçoit dès lors tout l'intérêt qui s'attache à l'influence des lipides sériques dans la réaction de précipitation spécifique.

S'il est facile de priver un sérum de ses lipides en vue d'études purement analytiques (technique de Kumagawa-Suto [72]), l'opération devient beaucoup plus délicate lorsqu'il s'agit d'études physicochimiques ou immunologiques. Les procédés analytiques classiques dénaturent les protéines et leur font perdre leurs propriétés physicochimiques et immunologiques. Il existe heureusement des techniques permettant de « délipider » le sérum sans dénaturer ses protéines. La technique originale de Hardy et Gardiner [48] sur laquelle nous allons revenir longuement, convient fort bien pour les travaux immunologiques : comme l'ont montré

ces auteurs, un sérum antitoxique délipidé à l'aide de cette méthode conserve intégralement la propriété de neutraliser la toxine correspondante.

La première étude concernant le rôle des lipides dans la réaction de précipitation spécifique revient à Hartley [49] : utilisant d'abord le système sérum de Cheval-antisérum de Lapin, cet auteur a montré que, si la délipidation du sérum antigène ou du sérum anticorps provoque un très net rétrécissement de la zone de floculation, l'enlèvement des lipides aux deux sérums supprime le phénomène. Signalons que, dans la plupart des cas, la délipidation du sérum anticorps suffit à supprimer la floculation (Tayeau, Neuzil et Pautrizel [160]). Hartley a étendu ses recherches au système toxine diphtérique-antisérum de Cheval et a prouvé que la délipidation de l'immunsérum amène la disparition du phénomène de précipitation spécifique.

Par la suite, l'observation de Hartley a pu être étendue à divers systèmes (Linderström-Lang et Schmidt [77], Horsfall et Goodner [64], Trensz [164], Ghosch et coll. [43], Delage [25], Neuzil [103], etc.).

Les substances lipidiques du sérum ne sont pas toutes responsables au même titre de ce phénomène : utilisant la technique de Tayeau [144], qui permet d'extraire électivement et quantitativement le cholestérol sérique, Tayeau et Neuzil [158] ont montré que le cholestérol n'intervient nullement dans la réaction de précipitation spécifique : un immunsérum floculant privé de son cholestérol flocule en présence de son antigène, exactement comme le sérum témoin. Tayeau, Neuzil et Pautrizel [160] ont prouvé, avec la généralité de ce phénomène, que les phosphatides jouent le rôle essentiel.

Il est fort intéressant de rapprocher cette constatation des travaux de Machebœuf et Tayeau, d'une part, et de ceux de Horsfall et Goodner d'autre part.

Machebœuf et Tayeau [96] démontrent que l'insolubilité des euglobulines dans l'eau pure se trouve conditionnée par les substances lipidiques fixées sur cette fraction, mais Tayeau [147] prouve que le cholestérol n'exerce aucun rôle et que cette insolubilité est due uniquement à la présence des phospholipides.

Horsfall et Goodner, étudiant le système antigène polyholosidique du pneumocoque-antisérum correspondant, notent que ce système ne flocule plus après délipidation de l'immunsérum, mais ils prouvent que l'addition de lécithines (dans le

cas du Cheval) ou de céphalines (dans le cas du Lapin) provoque la réapparition du pouvoir floculant [65]. Cette constatation de Horsfall et Goodner ne saurait cependant être généralisée, car elle n'a jamais pu être reproduite avec d'autres systèmes immunologiques [121] (*).

Les phosphatides occupent donc une place privilégiée parmi les substances lipidiques du sérum dans la réaction de précipitation, puisque seuls ils peuvent intervenir dans le phénomène de floculation. Il est intéressant de rappeler à ce sujet que seuls les phosphatides se trouvent unis directement aux protéines dans les associations lipido-protéidiques du sérum.

Cette propriété particulière des phosphatides doit-elle être rattachée à un phénomène purement immunologique ?

On peut répondre négativement à cette question, car Tayeau, M^lle^ Faure, Neuzil et Pautrizel restituent à un immunsérum de Lapin délipidé son pouvoir floculant après traitement par la ninhydrine [154] ou le β-naphtoquinone-4-sulfonate de sodium [159].

Bien des discussions ont eu lieu en ce qui concerne le mode d'action des lipides, et des doutes persistent toujours sur le rôle qu'il convient de leur attribuer; on s'en convaincra aisément en lisant la discussion parue sur ce sujet au colloque international des lipoprotéines (Birmingham, 1949 [148]).

Au cours de notre étude, nous passons tout d'abord en revue les diverses techniques de délipidation, ce qui nous conduit à opter pour la méthode de Hardy et Gardiner (I). Grâce à cette technique, nous réalisons une étude quantitative concernant l'influence de la délipidation sur la réaction de précipitation spécifique (II). Nous étudions ensuite l'effet exercé par la neutralisation préalable de l'anticorps délipidé (III), ainsi que le rôle joué par le moment où il est ajouté (IV). Nous examinons alors l'effet exercé par des protéines non immunes ou hétérologues délipidées ou non (V). A la lumière de quelques résultats expérimentaux, nous discutons enfin (VI) les procédés permettant de restituer à un sérum délipidé son pouvoir floculant.

(*) Signalons à ce sujet qu'un sérum antipneumococcique agglutinant perd ses propriétés agglutinantes par délipidation [121], alors qu'avec les autres systèmes on observe tout simplement un retard [16]. Cette observation montre le comportement un peu particulier des anticorps antipneumococciques.

I. — CHOIX D'UNE MÉTHODE POUR LA DÉLIPIDATION DES SÉRUMS IMMUNS

Dès le début de nos recherches sur le rôle des lipides dans la réaction de précipitation spécifique, nous avons été amené à étudier un certain nombre de méthodes de délipidation des protéines, afin de faire un choix parmi elles. Pour parvenir au but que nous nous étions proposé, une méthode de délipidation devait réunir les deux qualités suivantes :

1° Les lipides fixés aux globulines-anticorps doivent être enlevés aussi complètement que possible.

2° La protéine ne doit subir aucune dénaturation : le titre en anticorps, en particulier, doit être intégralement respecté.

On trouvera dans la littérature, surtout après 1920, la description de nombreuses techniques de délipidation répondant à ces deux critères. Presque toutes consistent à précipiter les protéines par un solvant ou un mélange de solvants organiques à très basse température. Dans ces conditions, les cénapses lipido-protéidiques se trouvent rompues; les lipides ainsi libérés sont extraits par le solvant, tandis que la basse température protège la protéine de toute injure.

Dans d'autres méthodes, cependant, les lipides sont déplacés de leur combinaison protéidique par addition au sérum de substances polyméthyléniques susceptibles de contracter avec les protéines des liaisons du même type que les lipides entrant dans la constitution des cénapses. Les lipides ainsi déplacés peuvent être alors extraits par un solvant organique convenable. Il s'agit donc là d'une application de la notion d'*icélomorphisme*.

Les méthodes du premier groupe répondant au principe énoncé ci-dessus diffèrent essentiellement entre elles par la nature du ou des solvants utilisés. Une étude rapide des résultats obtenus par les auteurs les ayant étudiées comparativement [103] nous a permis de sélectionner deux d'entre elles : la méthode de Piettre et Vila, la méthode de Hardy et Gardiner.

a) *Méthode de Piettre et Vila* [124]. — Cette méthode, proposée en 1920, utilise l'acétone. Plus tard, elle a été étudiée et modifiée par Adnot [2], puis par Saias [134]. Elle se

recommande par sa simplicité. Le mode opératoire est, en effet, le suivant :

La solution de protéines à délipider est amenée à une température voisine de 0° C, puis versée goutte à goutte en agitant dans cinq fois son volume d'acétone anhydre préalablement refroidie à — 10° C. On agite le mélange, on le replace à la température de — 10° C et, après quelques minutes, on sépare le précipité de protéines par centrifugation. L'acétone est décantée et le précipité est lavé à deux reprises pendant trente minutes environ avec de l'acétone refroidie à — 10° C. On termine par trois extractions du coagulum protéidique à l'éther anhydre, à froid pour les deux premières, à température ordinaire pour la dernière, chacune durant trente minutes environ et la séparation des protéines s'effectuant toujours par centrifugation. L'éther est ensuite éliminé par le vide : le coagulum protéidique est pulvérisé et la poudre remise en solution dans un volume d'eau physiologique égal au volume de la solution protéidique dont on est parti.

Pour obtenir une solution finale limpide, témoin d'une conservation satisfaisante de l'intégrité des protéines, il suffit que les produits en cours de délipidation soient constamment maintenus à une température inférieure à — 5° C, ce qui est aisément réalisable avec un simple mélange réfrigérant.

Nous nous sommes cependant peu servi de cette technique : la délipidation n'est en effet jamais complète et, même en prolongeant les durées de contact entre les protéines et les solvants, 15 à 20 p. 100 des lipides restent toujours fixés aux protéines. Il en résulte que parfois les anticorps ainsi délipidés continuent à floculer avec l'antigène correspondant. On note seulement un retard plus ou moins important de la floculation et un rétrécissement de la zone des proportions optima. Ce fait permet d'ailleurs de discuter de la différence de solidité des diverses cénapses lipido-protéidiques et de la relation existant entre la solidité de fixation des lipides et leur rôle dans l'insolubilisation du complexe spécifique [103].

b) *Méthode de Hardy et Gardiner* [48]. — Proposée dès 1910, cette méthode a été utilisée par la suite, modifiée et améliorée par de nombreux chercheurs, en particulier Hartley [49], Horsfall et Goodner [65], Young [172] et Hewitt [60]. En ce qui nous concerne, voici le mode opératoire que nous avons suivi :

La solution de protéines à délipider est amenée à une température voisine de 0° C, puis versée goutte à goutte en agitant dans

cinq fois son volume d'alcool à 95° préalablement refroidi à — 20° C. On met en suspension les protéines précipitées et on replace l'ensemble à — 20° C pendant deux heures en agitant de temps à autre. Le précipité de protéines est séparé par centrifugation, puis traité une nouvelle fois de façon identique par l'alcool. On pratique ensuite un troisième épuisement dans les mêmes conditions, mais avec de l'alcool absolu. On termine par trois extractions du coagulum protéidique à l'éther anhydre, chacune durant deux heures également, à froid pour les deux premières, à température ordinaire pour la dernière. A chaque changement de solvant, on sépare les protéines par centrifugation. L'éther est ensuite éliminé sous vide, le coagulum protéidique pulvérisé et la poudre obtenue finalement remise en solution dans un volume d'eau physiologique égal au volume de la solution protéidique dont on est parti.

Pour éviter toute dénaturation des protéines, il faut opérer à très basse température, les produits en cours de délipidation devant être constamment maintenus à une température inférieure à — 10° C. Ces conditions opératoires nous étaient faciles à réaliser puisque nous disposons d'une chambre frigorifique à — 25° C suffisamment vaste pour y loger un centrifugeur. Nous avons pu obtenir ainsi, dans tous les cas, une redissolution intégrale de nos poudres de protéines délipidées et la solution réalisée a toujours été parfaitement limpide, un peu moins pigmentée seulement que la solution de protéines non délipidées.

Le respect des protéines et en particulier des anticorps par cette méthode de délipidation est bien connu [140] ; nous avons pu le vérifier à plusieurs reprises. L'enlèvement des lipides est d'autre part pratiquement intégral, ce qui fait que les anticorps ainsi délipidés perdent dans presque tous les cas leur pouvoir floculant.

Tous ces avantages expliquent que nous nous soyons servi constamment de cette méthode de délipidation qui nous a toujours semblé excellente.

c) *Méthode de Delsal.* — Certains auteurs, cependant [28], ont été amenés à penser que, bien que non dénaturante au sens strict du terme, la déshydratation complète subie par les anticorps au cours de la délipidation, en modifiant leurs propriétés de surface, pouvait être tenue pour responsable de la perte du pouvoir floculant. Aussi avons-nous été amené à étudier une méthode échappant à ce reproche, celle de Mac Farlane [84]. Cette méthode, reprise ensuite par Delsal [27],

utilise l'éther seul ou additionné de très faibles quantités d'alcool à très basse température.

Nous avons utilisé le protocole suivant :

La solution de protéines à délipider est amenée à une température voisine de 0° C, puis versée goutte à goutte dans de l'éther préalablement refroidi à — 70° C, une température aussi basse étant obtenue grâce à de la neige carbonique. Après quelques minutes, on décongèle lentement la solution protéidique tout en l'agitant avec l'éther. On renouvelle ce solvant et on plonge de nouveau le mélange dans la neige carbonique. On pratique ainsi sept ou huit congélations et décongélations successives et on termine par un lavage à l'éther à température ordinaire.

TABLEAU I

Comparaison des techniques de Delsal, Hardy-Gardiner et Saias pour la délipidation du sérum.

Technique utilisée	Lipides totaux (g par litre)	Cholestéroi (mg par l)	Phosphore lipidique (mg par l)
Extraction par l'alcool et l'éther chauds	7,86	1 710	23,5
Extraction par l'éther à — 70° C	4,94	1 490	2
Extraction par l'éther à — 70° C additionné de 1 p. 100 d'éthanol	5,74	1 500	2,5
Extraction par l'éther à — 70° C additionné de 2 p. 100 d'éthanol	5,76	1 620	6
Extraction par l'éther à — 70° C additionné de 3 p. 100 d'éthanol	5,80	1 620	12,5
Extraction par l'éther à — 70° C additionné de 4 p. 100 d'éthanol	6,02	1 640	14
Extraction par l'éther à — 70° C additionné de 5 p. 100 d'éthanol	6,74	1 680	18
Extraction par l'alcool et l'éther à — 10° C (Hardy-Gardiner)	6,94	1 630	21
Extraction par l'acétone et l'éther à — 10° C (Saias)..	6,18	1 610	16,5

Nous avons soigneusement étudié cette technique, la comparant en particulier avec celle de Hardy et Gardiner. Nous avons pu vérifier l'assertion de Delsal disant que l'éther seul enlève le cholestérol sans presque toucher aux phospholipides, ceux-ci étant progressivement « décollés » lorsque l'on ajoute de l'alcool à l'éther dans la proportion de 1 à 10 p. 100. Nous n'avons pu cependant utiliser cette technique, car les anticorps dont nous disposions exigeaient au moins 4 à 5 p. 100 d'alcool pour être correctement délipidés, et cela nous donnait en fin d'opération une solution protéidique fortement opalescente traduisant une dénaturation manifeste des protéines.

Nous indiquons dans le tableau I les quantités comparées de lipides, de cholestérol et de phosphore lipidique que nous avons pu extraire de différents échantillons d'un même sérum humain en utilisant les techniques de Delsal, de Hardy et Gardiner et de Saias.

d) *Méthode de Machebœuf et Tayeau.* — Enfin, nous avons effectué quelques délipidations en utilisant la méthode de Machebœuf et Tayeau [96]. Dans cette technique, les lipides sont déplacés par l'addition d'une solution de savon et extraits (ainsi que le savon en excès) au moyen d'éther. Au cours de nos expériences, nous avons employé comme savon le ricinoléate de sodium à la dose de 15 mg par cm^3 de sérum. Nous n'avons que peu utilisé cette technique, car elle présentait pour nous deux inconvénients : tout d'abord la délipidation n'est pas complète, car les lipides fixés sur la fraction acido-précipitable de Machebœuf ne sont pas touchés; il est vrai que cette fraction, qui fait partie des albumines (relargage), n'intervient pas dans la précipitation spécifique; d'autre part, la délipidation par la méthode au savon exige, pour être correcte, de porter sur un sérum frais, ce qui n'était pas le cas de la plupart de nos sérums immuns.

Nous pouvons donc conclure que la méthode de délipidation à l'alcool puis à l'éther de Hardy et Gardiner est celle qui nous a semblé, par son efficacité, répondre le mieux à nos besoins; ceci explique que nous l'ayons utilisée dans presque toutes les expériences que nous décrirons par la suite.

II. — ÉTUDE DE L'INFLUENCE EXERCÉE PAR LA DÉLIPIDATION SUR LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION

Nos essais préliminaires ont consisté à vérifier la conclusion de HARTLEY selon laquelle la délipidation d'un immunsérum précipitant amène un retard de la floculation, lorsque l'anticorps est mis en présence d'une quantité convenable d'antigène. Ces essais ont porté sur deux systèmes :

1° Toxine diphtérique-antisérum de Cheval;

2° Pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin.

Nous avons placé chacun des immunsérums préalablement délipidé en contact avec son antigène à des concentrations correspondant à la zone d'équivalence (neutralisation exacte de l'anticorps par l'antigène). Nous avons constaté qu'après un certain temps de séjour au bain-marie, les mélanges devenaient opalescents. De plus, après une durée d'immersion dix fois supérieure au temps de floculation du sérum témoin non délipidé, aucun floculat ne s'est produit.

Au cours d'expériences ultérieures, nous avons cependant trouvé des systèmes floculants pour lesquels la délipidation n'inhibe pas complètement la floculation mais la ralentit seulement tout en rétrécissant la zone des proportions optima (*) : les anticorps de Lapin antiovalbumine ou antialbumine de Cheval représentent un exemple de ces précipitines relativement peu sensibles à la délipidation.

En passant en revue un grand nombre de couples immunologiques, nous avons pu mettre en évidence toute une gamme de systèmes pour lesquels la délipidation du sérum anticorps provoque un retard pouvant aller jusqu'à l'inhibition totale, ce dernier cas étant le plus courant.

Ces constations prouvent que l'expression « inhibition de la floculation » utilisée par la plupart des auteurs (HARTLEY, LINDERSTRÖM-LANG et SCHMIDT) est sans doute trop absolue. La délipidation de l'immunsérum provoque en réalité un retard

(*) Lorsque l'on trace la courbe représentative des variations de l'azote précipité ou des temps de floculation en fonction de la quantité d'antigène ajoutée à un même volume d'immunsérum, cette courbe passe par un maximum dans le premier cas, un minimum dans le second; ce maximum ou ce minimum est généralement assez étalé et constitue la zone des proportions optima ou encore la zone de primofloculation.

de la floculation; souvent ce retard est très grand et il devient alors impossible de faire la distinction entre la floculation spécifique et l'insolubilisation de protéines dénaturées. Cette conclusion rejoint, en partie tout au moins, celles de KRUEGER et HEIDELBERGER [71] sur lesquelles nous serons appelé à revenir plus loin.

Nous nous sommes alors demandé s'il était nécessaire que la totalité de l'immunsérum soit délipidée pour obtenir un retard de la floculation. LINDERSTRÖM-LANG et SCHMIDT [77] avaient déjà tenté quelques essais sur ce sujet, mais ils n'avaient pas étudié le phénomène systématiquement : cela est cependant nécessaire si l'on veut interpréter le rôle exercé par les lipides dans la précipitation spécifique.

Dans les expériences que nous avons réalisées, nous avons mis en œuvre des immunsérums, dont une certaine partie seulement avait subi la délipidation. Nous avons pu étudier ainsi quantitativement l'influence exercée par le taux de délipidation sur la vitesse de floculation.

Nos essais ont porté sur les deux systèmes :

— Toxine diphtérique-antisérum de Cheval;

— Pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin.

Nous présentons ici un exemple des résultats que nous avons obtenus dans ces conditions :

a) *Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval*

Nous avons tout d'abord réalisé les mélanges suivants :

1.	Sérum immun non délipidé dilué au 1/10	
2.	Sérum immun non délipidé dilué au 1/10..	19/20
	Sérum immun délipidé dilué au 1/10.....	1/20
3.	Sérum immun non délipidé dilué au 1/10..	9/10
	Sérum immun délipidé dilué au 1/10.....	1/10
4.	Sérum immun non délipidé dilué au 1/10..	4/5
	Sérum immun délipidé dilué au 1/10.....	1/5
5.	Sérum immun non délipidé dilué au 1/10..	2/3
	Sérum immun délipidé dilué au 1/10.....	1/3
6.	Sérum immun non délipidé dilué au 1/10..	1/2
	Sérum immun délipidé dilué au 1/10.....	1/2

Avec chacun de ces mélanges nous réalisons la gamme suivante :

Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mélange anticorps (cm³)....	1,00	1,025	1,050	1,075	1,100	1,125	1,150	1,175	1,200
Eau physiologique (cm³)...	0,200	0,175	0,150	0,125	0,100	0,075	0,050	0,025	0
Anatoxine diphtérique (cm³).	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Les temps de floculation suivants ont été notés dans le tableau II (*) :

TABLEAU II

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR LA DÉLIPIDATION DE L'IMMUNSÉRUM (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

	Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1.....	**25**	26	26	30	28	35	36	38	46
	Série n° 2.....	31	**27**	30	34	34	33	38	41	46
	Série n° 3.....	35	**33**	68	35	38	40	46	47	54
	Série n° 4.....	65	63	**62**	63	65	67	69	75	77
	Série n° 5.....	130	129	128	127	125	**115**	123	120	137
	Série n° 6.....	5 h. 55	5 h. 55	5 h. 45	5 h. 40	5 h. 25	5 h. 20	5 h. 25	5 h. 20	**5 h. 15**

N. B. — Dans tous nos tableaux, le temps de floculation indiqué en caractères gras correspond à la primofloculation.

(*) Nous avons volontairement réalisé des mélanges antigène-anticorps dans des proportions telles que la primofloculation de la série témoin se produise dans le premier tube; cela permet de mieux apprécier le déplacement de cette primofloculation lorsque la teneur en immunsérum délipidé augmente.

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous avons réalisé les mélanges suivants :

1. Sérum immun non délipidé.
2. { Sérum immun non délipidé..... 2/3
   { Sérum immun délipidé..... 1/3
3. { Sérum immun non délipidé..... 1/2
   { Sérum immun délipidé..... 1/2
4. { Sérum immun non délipidé..... 1/3
   { Sérum immun délipidé..... 2/3

Avec chacun de ces mélanges nous réalisons la gamme suivante :

Tubes n°	1	2	3	4
Mélange anticorps dilué au 1/8 (cm³).....	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution de l'antigène (0,5 cm³ par tube).	1/32	1/64	1/128	1/256

Tous nos tubes ont alors été placés au bain-marie à 37° C et nous indiquons dans le tableau III les temps de floculation notés.

TABLEAU III

Influence exercée sur la vitesse de floculation par la délipidation de l'immunsérum (système pseudoglobulines de Cheval - antisérum de Lapin).

Tubes n°		1	2	3	4
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1.....	22	**19**	23	42
	Série n° 2.....	72	48	**45**	58
	Série n° 3.....	> 3 h.	2 h. 30	**86**	90
	Série n° 4.....	> 3 h.	> 3 h.	2 h. 15	**2 h. 15**

Ces résultats montrent non seulement que la délipidation des anticorps empêche leur floculation, mais que l'addition d'anticorps délipidés à un système immunologique normal entraîne une inhibition de la précipitation spécifique. Pour

certains systèmes, cette inhibition commence à s'exercer pour des proportions très faibles d'anticorps délipidés.

Nos investigations ont montré que, dans un même système, il existe des différences de sensibilité considérables à l'action d'un immunsérum délipidé. D'une manière générale cette sensibilité est en relation avec l'avidité de l'immunsérum, c'est-à-dire sa rapidité de combinaison avec son antigène et par conséquent de floculation. Ce parallélisme n'est cependant pas absolument rigoureux et nous avons rencontré parfois des sérums immuns peu avides qui se montraient assez peu sensibles à l'influence du sérum immun délipidé et inversement.

Il convient de noter encore que, pour chaque mélange, le tube de primofloculation dépend de la proportion d'immunsérum délipidé mise en œuvre : plus cette proportion est grande, plus le mélange correspondant à la primofloculation évolue vers l'excès d'anticorps; on aurait tendance à penser, a priori, que la délipidation a provoqué une dénaturation partielle des anticorps et, en conséquence, une diminution de leur titre. Nous allons avoir l'occasion d'interpréter cette constatation à la lumière des diverses conceptions sur le mécanisme de la précipitation spécifique.

Quelles raisons peuvent donc être invoquées pour expliquer le retard à la floculation produit par la délipidation de l'immunsérum ?

L'une des réponses à cette question ressort des travaux de Boyd [13] : cet auteur pense que les lipides des lipoprotéines sériques doivent être indispensables à leur structure secondaire. Si donc on enlève les lipides, la structure se modifie et la coadaptation de l'antigène avec l'anticorps n'est plus aussi parfaite; certains groupes polaires restent « vacants » et l'attraction pour l'eau se trouve alors augmentée; on conçoit que, dans ces conditions, le complexe antigène-anticorps reste en solution. Nous apportons plus loin un argument en faveur de cette conception en prouvant que le complexe antigène-anticorps délipidé se forme plus lentement que le complexe témoin non délipidé (voir p. 84).

Il semble ressortir d'un certain nombre d'études expérimentales mettant en œuvre l'électrophorèse (Katsura [68]) et l'ultracentrifugation (Pedersen [123]) que la délipidation amènerait la formation d'agrégats masquant certains groupes réactifs. Les travaux de Pope [127], qui ont montré qu'après action d'un enzyme protéolytique un immunsérum délipidé

récupère ses propriétés floculantes, plaident en faveur de cette conclusion : l'hydrolyse ferait alors apparaître les groupements primitivement masqués.

On a pensé encore que la délipidation pouvait transformer les anticorps polyvalents ou bivalents en anticorps monovalents (*) et faire ainsi disparaître la floculation (Singer, Campbell, Oikawa, Marrack, Pauling, etc., voir Orlans [113]). Si cette conception correspondait à la réalité, le titre en anticorps de chacun de nos mélanges devrait être inversement proportionnel à la quantité d'anticorps délipidés qu'il contient; or, bien qu'évoluant en sens contraire, il est loin d'être inversement proportionnel.

Krueger et Heidelberger [71] comparent les lipides du complexe antigène-anticorps à un véritable ciment facilitant l'union de ces deux constituants. Ils fondent leur conception sur le fait que le mélange antigène-antisérum délipidé soumis à un champ de gravité (centrifugation) flocule. Personnellement, nous n'avons jamais pu observer ce phénomène (voir p. 70).

Nous pensons, pour notre part, que la délipidation intervient :

1° En augmentant l'hydrophilie des protéines en raison du départ de la micelle lipidique hydrophobe;

2° En faisant apparaître certains groupes hydrophiles : nous avons signalé dans le second chapitre de notre étude historique que la micelle lipidique, considérée comme un tout, était fixée à la protéine par une liaison ionique : l'enlèvement des lipides laisse donc apparaître des groupes positifs hydrophiles sur la protéine;

3° En altérant, sinon la spécificité de l'anticorps, tout au moins son avidité par l'apparition de fonctions nouvelles. Sa spécificité est en effet régie par les groupements dont se trouve hérissée sa molécule et toute altération même minime de cette spécificité se reflète sur l'avidité.

Notre conception qui fait intervenir non seulement les forces non spécifiques (solubilité), mais encore les forces spécifiques, n'est nullement en désaccord avec la théorie de Marrack. Nous concevons fort bien qu'à la zone des proportions

(*) Il s'agit d'anticorps capables de se combiner encore à l'antigène, mais incapables de donner avec lui un complexe insoluble. Comme le fait justement remarquer Neuzil [103], le terme de « univalent » n'est pas employé ici dans un sens très correct. Le terme de « incomplet » ou encore « imparfait » est préférable.

optima, nous ayons un complexe du type représenté par la figure 6, dans lequel les molécules d'anticorps délipidé sont

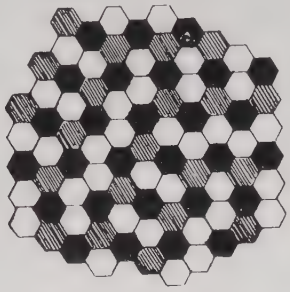

Fig. 6.

Modèle de constitution d'un complexe spécifique dans la zone d'équivalence.

En noir : antigène.

En blanc : anticorps normal.

En hachures : anticorps délipidé.

représentées par des hachures. Dans ce complexe, le rapport $\frac{\text{groupes hydrophiles libres}}{\text{volume de l'agrégat}}$ est plus élevé que dans le système témoin non délipidé. Il faut donc que le complexe atteigne une taille beaucoup plus élevée pour pouvoir précipiter.

Nous sommes tenté d'ajouter encore un complément à cette conception : étant donné, comme nous le montrerons (voir p. 84), que le sérum non délipidé se combine plus rapidement à l'antigène que le sérum délipidé, on pourrait penser que les molécules d'anticorps non délipidé occupent le « noyau » de l'agrégat, tandis que les molécules délipidées se trouvent plutôt réparties vers la périphérie; ceci ne ferait qu'augmenter encore davantage l'hydrophilie de l'agrégat et renforcer notre conception, mais les recherches qui suivent indiqueront qu'il n'en est probablement pas ainsi.

Est-il possible d'expliquer maintenant le déplacement du titre en anticorps observé en présence de sérum délipidé ? Il semble que l'éventualité de protéines dénaturées par la délipidation soit à rejeter : Tayeau, M^lle^ Faure, Neuzil et Pautrizel [154] ont montré, en effet, qu'il était possible de restituer le pouvoir floculant d'un immunsérum de Lapin délipidé, en faisant agir sur lui de la ninhydrine dans des conditions

déterminées par ces auteurs, et de retrouver ainsi le titre primitif en anticorps.

Nous pensons, pour notre part, que la combinaison entre l'anticorps délipidé et l'antigène s'effectue beaucoup plus lentement qu'avec le système non délipidé. Dans ces conditions, la floculation apparaît alors qu'une partie de l'anticorps délipidé se trouve encore à l'état libre : tout se passe donc comme si une partie de l'anticorps échappait à la réaction, c'est-à-dire comme si le sérum était moins riche en anticorps que le témoin. On conçoit alors que plus le milieu est riche en sérum délipidé, plus le titre se trouve déplacé; de plus, l'avidité du sérum délipidé vis-à-vis de l'antigène étant moindre que celle du sérum normal, l'équilibre antigène/anticorps serait alors déplacé au profit de l'anticorps normal non délipidé. L'étude qui va suivre nous permettra de discuter cette hypothèse.

III. — INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION D'IMMUNSÉRUM HOMOLOGUE DÉLIPIDÉ PRÉALABLEMENT NEUTRALISÉ PAR L'ANTIGÈNE

Pour pouvoir expliquer les essais précédemment décrits, nous avons admis que le complexe antigène-anticorps délipidé se formait beaucoup moins rapidement que le complexe antigène-anticorps normal. Cette conception peut conduire à deux hypothèses :

1° Les complexes antigène-anticorps normal pourraient, comme nous le supposons plus haut, former la partie centrale, le « noyau », de l'agrégat, tandis que les complexes antigène-anticorps délipidé seraient répartis au contraire vers la périphérie.

Si cette conception correspond à la réalité, l'addition du complexe antigène-anticorps délipidé, préparé à l'avance, doit se montrer moins efficace dans l'inhibition de la floculation que l'anticorps délipidé seul; on peut admettre, en effet, que dans ces conditions, le complexe antigène-anticorps délipidé préformé participe au noyau de l'agrégat et cela aux dépens de la périphérie; celle-ci serait en conséquence moins riche en groupements hydrophiles et l'agrégat serait ainsi moins soluble.

2° On peut admettre encore qu'il se produit un simple déplacement de l'équilibre antigène-anticorps; dans ce cas, le contact préalable de l'antigène avec l'anticorps délipidé n'exercera aucune influence sur le pouvoir inhibiteur.

C'est pour pouvoir résoudre ce problème que nous avons réalisé de nouveaux essais. Nous avons effectué de très nombreuses expériences qui ont toutes donné le même résultat. Nous ne mentionnerons ici que celles correspondant aux deux systèmes que nous avons surtout utilisés.

a) *Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval*

Nous prenons trois séries de tubes dans lesquels nous réalisons les mélanges suivants :

Tubes n°		1	2	3	4
Série n° 1..	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,4	0,5	0,6	0,7
	Eau physiologique (cm³).....	0,3	0,2	0,1	0
	Anatoxine diphtérique (cm³).....	1	1	1	1
Série n° 2..	Sérum immun délipidé dilué au 1/4 (cm³).	0,08	0,10	0,12	0,14
	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,32	0,40	0,48	0,56
	Eau physiologique (cm³).....	0,3	0,2	0,1	0
	Anatoxine diphtérique (cm³).....	1	1	1	1
Série n° 3..	Sérum immun délipidé dilué au 1/4 (cm³).	0,08	0,10	0,12	0,14
	Anatoxine diphtérique (cm³).....	0,2	0,2	0,2	0,2
	Bain-marie à 37° C pendant deux heures; attente : quinze minutes.				
	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,32	0,40	0,48	0,56
	Eau physiologique (cm³).....	0,3	0,2	0,1	0
	Anatoxine diphtérique (cm³).....	0,8	0,8	0,8	0,8

Nous plaçons ces différents mélanges au bain-marie. Les temps de floculation indiqués dans le tableau IV ont été notés.

TABLEAU IV

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION D'IMMUNSÉRUM HOMOLOGUE DÉLIPIDÉ, PRÉALABLEMENT NEUTRALISÉ PAR L'ANTIGÈNE (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Tubes n°		1	2	3	4
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1.....	70	**38**	45	69
	Série n° 2.....	3 h.	95	**55**	90
	Série n° 3.....	> 3 h.	102	**55**	86

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous avons réalisé, au cours de cette expérience, les quatre séries de mélanges suivantes :

Tubes n°		1	2	3	4
Série n° 1..	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,5	0,5	0,5	0,5
	Eau physiologique (cm³).....	1	1	1	1
	Dilution de l'antigène (0,5 cm³ par tube)..	1/32	1/64	1/128	1/256
Série n° 2..	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,5	0,5	0,5	0,5
	Sérum immun délipidé dilué au 1/4 (cm³).	0,5	0,5	0,5	0,5
	Dilution de l'antigène (1 cm³ par tube)...	1/32	1/64	1/128	1/256
Série n° 3..	Sérum immun délipidé dilué au 1/4 (cm³).	0,5	0,5	0,5	0,5
	Dilution de l'antigène (0,5 cm³ par tube)..	1/32	1/64	1/128	1/256
	Bain-marie à 37° C pendant trois heures.				
	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,5	0,5	0,5	0,5
	Dilution de l'antigène (0,5 cm³ par tube)..	1/32	1/64	1/128	1/256
Série n° 4..	Sérum immun délipidé dilué au 1/4 (cm³).	0,5	0,5	0,5	0,5
	Dilution de l'antigène (1 cm³ par tube)...	1/32	1/64	1/128	1/256
	Bain-marie à 37° C pendant trois heures.				
	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,5	0,5	0,5	0,5

On place au bain-marie à 37° C ces différentes séries de tubes et l'on note les temps de floculation rapportés dans le tableau V.

TABLEAU V

Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition d'immunsérum homologue délipidé, préalablement neutralisé par l'antigène (système pseudoglobulines de Cheval - antisérum de Lapin).

Tubes n°		1	2	3	4
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1	35	**30**	35	47
	Série n° 2	1 h. 50	1 h. 30	1 h. **20**	1 h. 45
	Série n° 3	2 h. 10	1 h. 45	**1 h. 45**	1 h. 55
	Série n° 4	> 2 h. 30	2 h. 10	**2 h. 10**	2 h. 30

Ces deux séries d'expériences montrent nettement que le sérum délipidé préalablement neutralisé par l'antigène ou le sérum délipidé qui n'a pas été neutralisé inhibent d'une façon comparable la réaction de précipitation spécifique.

Ce résultat nous conduit à admettre la seconde des hypothèses que nous avions formulées : l'avidité moindre de l'anticorps délipidé vis-à-vis de l'antigène déplace l'équilibre de la réaction. Il suppose, en outre, une facile décomposition du complexe antigène-anticorps délipidé, nécessaire à l'établissement de cet équilibre : cette notion est tout à fait en accord avec l'opinion de Pauling et coll. [118] qui, par des recherches différentes des nôtres, sont arrivés à la même conclusion.

Il est encore intéressant de signaler le fait suivant qui ressort de la seconde expérience : lorsque le sérum délipidé a été traité préalablement par une quantité d'antigène supérieure à celle correspondant à la primofloculation, l'inhibition est encore plus marquée.

Afin de voir si cette constatation pouvait être généralisée, nous avons effectué de nouvelles expériences portant sur le système toxine diphtérique-antisérum de Cheval.

Voici par exemple l'une d'entre elles. Nous avons réalisé les trois séries de mélanges suivantes :

Tubes n°		1	2	3	4
Série n° 1..	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,40	0,50	0,60	0,70
	Eau physiologique (cm³).....	0,30	0,20	0,10	0
	Anatoxine diphtérique (cm³).....	1	1	1	1
Série n° 2..	Sérum immun délipidé dilué au 1/4 (cm³).	0,08	0,10	0,12	0,14
	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,32	0,40	0,48	0,56
	Eau physiologique (cm³).....	0,30	0,20	0,10	0
	Anatoxine diphtérique (cm³).....	1	1	1	1
Série n° 3..	Sérum immun délipidé dilué au 1/4 (cm³).	0,08	0,10	0,12	0,14
	Anatoxine diphtérique (cm³).....	1	1	1	1
	Bain-marie à 37° C pendant trois heures.				
	Eau physiologique (cm³).....	0,30	0,20	0,10	0
	Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)..	0,32	0,40	0,48	0,56

Nous plaçons au bain-marie à 37° C ces différentes séries de tubes et nous notons les temps de floculation (tableau VI).

TABLEAU VI

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION D'IMMUNSÉRUM HOMOLOGUE DÉLIPIDÉ, PRÉALABLEMENT NEUTRALISÉ PAR UN EXCÈS D'ANTIGÈNE (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Tubes n°		1	2	3	4
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1.....	83	**75**	80	90
	Série n° 2.....	3 h. 40	**110**	120	3 h. 50
	Série n° 3.....	4 h.	**125**	150	4 h. 45

Ce nouvel essai confirme en tous points le précédent.
Comment peut-on expliquer cette constatation ?
La quantité totale d'antigène mise en œuvre dans chaque

expérience correspond à la neutralisation exacte des anticorps (délipidé et non délipidé) ; si donc la portion de sérum ayant été délipidée est préalablement mise en contact avec un excès d'antigène, la portion non délipidée se trouve de ce fait en présence d'une quantité d'antigène inférieure à l'optimum; il se forme donc tout de suite des complexes antigène-sérum immun non délipidé correspondant à un excès d'anticorps (voir fig. 1, D) et particulièrement solubles. Dans ces conditions, l'équilibre se trouve perturbé et le nouveau complexe formé, moins riche en anticorps, flocule plus tardivement.

Cette conception postule une plus grande stabilité des complexes antigène-anticorps non délipidé et se montre tout à fait conforme aux hypothèses précédemment émises.

Afin de confirmer encore les résultats précédents, nous avons réalisé une dernière série d'expériences fondées sur le raisonnement suivant :

Tous nos essais concourent à nous faire admettre — phénomène que nous vérifions plus loin — que les complexes antigène-anticorps délipidé mettent beaucoup plus de temps à se former que les complexes témoins antigène-anticorps normal, ce qui explique d'ailleurs la relative instabilité des premiers et leur facile réversibilité.

S'il en est réellement ainsi, cette réversibilité doit être moindre lorsque les complexes ont eu le temps de se former et ont acquis ainsi une relative stabilité; autrement dit, le complexe antigène-anticorps délipidé doit exercer sur le complexe normal un effet inhibiteur moins accentué lorsque ses constituants sont restés longtemps en contact.

Nous rapportons ici un exemple des résultats que nous avons obtenus dans ces conditions.

a) *Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval*

Après avoir déterminé les quantités d'antigène et d'anticorps correspondant à l'optimum immunologique, nous réalisons, aussi aseptiquement que possible (*), des mélanges de 0,1 cm^3 de sérum immun délipidé dilué au 1/5 et de 0,2 cm^3 d'anatoxine diphtérique pure et nous plaçons ces mélanges à l'étuve à 37° C.

(*) Ceci afin d'éviter un envahissement microbien de nos mélanges. Malgré ces précautions, la durée maximum de conservation est de l'ordre d'une semaine.

Après des durées variables de séjour en étuve, ces mélanges sont additionnés de :

0,5 cm³ de sérum immun normal dilué au 1/5,
1 » cm³ d'anatoxine diphtérique pure.

Nous constituons chaque fois un tube témoin dans lequel le mélange antigène-anticorps délipidé est remplacé par 0,3 cm³ d'eau physiologique.

Les temps de floculation observés pour ces différents mélanges sont consignés dans le tableau VII.

TABLEAU VII

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DU COMPLEXE ANTIGÈNE - ANTICORPS HOMOLOGUE DÉLIPIDÉ (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Durée du séjour en étuve..		0	4 h.	8 h.	1 j.	2 j.	6 j.
Temps de floculation	Témoin.....	1 h. 10	1 h. 10	1 h. 20	1 h. 20	1 h. 20	1 h. 15
	Sérum délipidé.	3 h. 30	3 h. 30	2 h. 55	2 h. 30	2 h. 10	2 h. 0

Ces résultats confirment en tous points notre hypothèse : lorsque l'antigène et l'anticorps délipidé sont restés longtemps en contact, le complexe formé a acquis une relative stabilité; sa réversibilité se trouve diminuée et, en conséquence, son effet inhibiteur sur la floculation du système normal est ralenti à son tour.

Nous ne pourrons, cependant, conclure qu'il en est bien ainsi qu'après vérification du phénomène à l'aide d'un autre système immunologique.

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous déterminons tout d'abord les quantités d'antigène et d'anticorps correspondant à l'optimum immunologique, puis nous réalisons, aussi aseptiquement que possible, des mélanges de : 0,5 cm³ de sérum immun délipidé,

0,5 cm³ d'antigène convenablement dilué.

Nous plaçons ces mélanges à l'étuve à 37° C.

Après des durées variables de séjour en étuve, ces mélanges sont additionnés de 0,5 cm³ de sérum immun normal et 0,5 cm³ d'antigène à la même dilution que précédemment.

Nous préparons chaque fois un tube témoin dans lequel le mélange antigène-anticorps délipidé est remplacé par 1 cm³ d'eau physiologique.

Voici les temps de floculation que nous avons notés avec ces différents mélanges (tableau VIII) :

TABLEAU VIII

Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition du complexe antigène - anticorps homologue délipidé (système pseudoglobulines de Cheval - antisérum de Lapin).

Durée du séjour en étuve.....		0	4 h.	1 j.	2 j.	5 j.
Temps de floculation	Témoin.....	26	25	22	22	22
	Sérum délipidé...	2 h. 45	2 h. 30	2 h. 05	1 h. 55	2 h. 0

Ces résultats sont donc tout à fait superposables à ceux obtenus avec le système toxine diphtérique-immunsérum de Cheval et montrent qu'à la longue le complexe antigène-anticorps délipidé acquiert une relative stabilité.

IV. — INFLUENCE EXERCÉE PAR LE MOMENT D'ADDITION DE L'IMMUNSÉRUM DÉLIPIDÉ A UN SYSTÈME FLOCULANT

Dans toutes les études qui précèdent, nous avons fait allusion à la facile décomposition du complexe antigène-anticorps délipidé, surtout lorsque le contact entre les deux constituants n'a pas été extrêmement prolongé; par ailleurs, nous avons été amené à noter la relative stabilité du complexe antigène-anticorps non délipidé. Pour prouver la réalité de cette conception, base de nos interprétations, nous avons réalisé diverses expériences qui ont consisté à ajouter l'immunsérum délipidé (premier cas) ou le complexe antigène-anticorps délipidé (deuxième cas) au système floculant, après des temps variables; si les complexes antigène-anticorps normal et antigène-anticorps délipidé présentent la même stabilité et sont donc susceptibles de se décomposer aussi rapidement, le temps après lequel l'anticorps normal ou déli-

pidé est ajouté n'exercera pas une bien grande influence; si, au contraire, le système normal est beaucoup plus stable que le système délipidé, le facteur temps jouera un rôle essentiel et l'effet inhibiteur sera d'autant plus grand que l'addition aura été plus précoce.

A. — Addition d'immunsérum délipidé

Nous avons pris deux séries de tubes et avons placé dans chacun d'eux du sérum de Cheval antidiphtérique et de l'anatoxine diphtérique en proportions correspondant à l'optimum immunologique. Ces tubes ont alors été placés au bain-marie.

Puis, à des intervalles de temps variables, nous avons ajouté 50 p. 100 d'anticorps supplémentaires, non délipidés dans la première série et délipidés dans la seconde. Nous avons finalement noté les temps de floculation de ces différents mélanges, et nous les consignons dans le tableau IX.

TABLEAU IX

Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition, après des temps variables, de l'immunsérum homologue délipidé (système toxine diphtérique - antisérum de Cheval).

Temps après lequel l'immunsérum est ajouté (en minutes)		0	5	10	15	22	30
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1..	133	77	49	38	33	36
	Série n° 2..	168	95	59	40	34	36

(Le mélange témoin non enrichi en anticorps flocule en 32 minutes.)

Nous voyons par conséquent :

1° Que l'addition du sérum immun exerce effectivement une influence d'autant plus grande que l'addition a été faite plus précocement; elle est pratiquement nulle après un laps de temps d'une durée égale à environ la moitié du temps de floculation du mélange témoin.

2° Qu'il y a un parallélisme absolu entre l'action inhibitrice du sérum immun non délipidé et celle du sérum immun délipidé, mais qu'elle est nettement plus importante dans le cas de ce dernier.

Nous avons réalisé une expérience analogue avec le système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin.

On ajoute ici une quantité d'anticorps égale à celle qui est déjà au contact de l'antigène.

Les durées de floculation des différents mélanges réalisés sont rapportées dans le tableau X.

TABLEAU X

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION, APRÈS DES TEMPS VARIABLES, DE L'IMMUNSÉRUM HOMOLOGUE DÉLIPIDÉ (SYSTÈME PSEUDOGLOBULINES DE CHEVAL-ANTISÉRUM DE LAPIN).

Temps après lequel l'immunsérum est ajouté (en minutes)		0	2	6	10	15	20	25	30
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1..	65	55	56	53	52	48	44	42
	Série n° 2..	155	110	86	80	82	60	50	45

(Le mélange témoin non enrichi en anticorps flocule en 42 minutes.)

Ces résultats sont donc tout à fait comparables aux précédents relatifs au système toxine diphtérique-immunsérum de Cheval.

B. — ADDITION D'IMMUNSÉRUM DÉLIPIDÉ PRÉALABLEMENT NEUTRALISÉ

Nous nous sommes demandé ensuite si la neutralisation préalable par son antigène du sérum délipidé ne serait pas susceptible de modifier son action inhibitrice lorsqu'on l'ajoute au système homologue en cours de floculation. Nous avons réalisé de nombreux essais faisant varier en particulier la durée de neutralisation du sérum délipidé.

Nous indiquons ici les résultats obtenus dans deux de ces expériences réalisées avec les mêmes systèmes immunologiques que les précédents.

a) *Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval*

Nous réalisons une série de mélanges constitués par 0,75 cm³ de sérum de Cheval antidiphtérique dilué au 1/10 et 1 cm³ de

toxine diphtérique diluée au 1/2 (optimum immunologique).

Nous avons, d'autre part, mélangé 0,75 cm³ de sérum de Cheval immun délipidé dilué au 1/5 et 2 cm³ de toxine diphtérique diluée au 1/2 et avons placé ce mélange au bain-marie à 37° C pendant deux heures.

Puis à des temps variables après la mise au bain-marie de notre première série de mélanges, nous avons ajouté à ces derniers 0,2 cm³ de ce liquide devenu légèrement opalescent et contenant l'anticorps délipidé et neutralisé. Nous avons finalement noté les temps écoulés entre la mise au bain-marie de la série de mélanges et leur floculation (tableau XI).

TABLEAU XI

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION, APRÈS DES TEMPS VARIABLES, DE L'IMMUNSÉRUM HOMOLOGUE DÉLIPIDÉ, PRÉALABLEMENT NEUTRALISÉ PAR L'ANTIGÈNE (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Temps après lequel l'immunsérum délipidé neutralisé est ajouté (en mn)	0	2	5	10	20	30
Temps de floculation (en minutes)	165	152	130	107	73	58

(Un mélange témoin qui reçoit 0,2 cm³ d'eau physiologique à la trentième minute flocule en 53 minutes.)

On voit donc ici encore que l'immunsérum délipidé, même neutralisé par l'antigène correspondant, inhibe la floculation du mélange homologue. L'importance de cette inhibition décroît rapidement à mesure que l'on attend davantage pour agir sur le système floculant; elle devient pratiquement négligeable lorsque l'on a attendu une durée supérieure à la moitié du temps de floculation du mélange témoin.

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous prenons une série de huit tubes dans lesquels nous plaçons 0,5 cm³ d'immunsérum normal dilué au 1/8 et 0,5 cm³ de l'antigène dilué au 1/128 (optimum immunologique). Ces mélanges sont portés au bain-marie à 37° C. Nous avons, d'autre part, mis pendant deux heures au bain-marie un mélange de 4 cm³ de sérum immun délipidé et dilué au 1/8 et 4 cm³ de solution de pseudoglobulines de Cheval diluée au 1/128.

A des intervalles de temps variables, nous plaçons 1 cm³ de ce mélange dans un des mélanges mis à floculer et nous notons le temps écoulé entre la mise au bain-marie et l'apparition du précipité spécifique.

Nous rapportons dans le tableau XII les chiffres que nous avons obtenus dans ces conditions.

TABLEAU XII

Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition, après des temps variables, de l'immunsérum homologue délipidé, préalablement neutralisé par l'antigène (système pseudoglobulines de Cheval - antisérum de Lapin).

Temps après lequel l'immunsérum délipidé neutralisé est ajouté (en minutes)	0	2	6	10	15	20	30
Temps de floculation (en mn)..	120	86	68	56	49	45	42

(Un mélange témoin qui reçoit 1 cm³ d'eau physiologique à la trentième minute flocule en 40 minutes.)

Les résultats que nous obtenons ici sont donc absolument superposables à ceux fournis par le système toxine diphtérique-immunsérum de Cheval.

Ces divers essais montrent, ainsi que nous l'avions supposé, que le complexe antigène-anticorps normal possède une beaucoup plus grande stabilité que le complexe antigène-anticorps délipidé.

Le fait que l'anticorps délipidé ou le complexe antigène-anticorps délipidé ne joue qu'un rôle minime lorsqu'il est ajouté après un temps égal ou supérieur à la moitié du temps de floculation laisse supposer que l'agrégat est à peu près formé à la moitié du temps de floculation.

La réaction antigène-anticorps débute donc très rapidement et va en évoluant de plus en plus lentement jusqu'à la floculation. Nos expériences mettant en œuvre la diffusion latérale de la lumière (voir chapitre II) prouveront qu'il en est bien ainsi.

V. — INFLUENCE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS IMMUNES DÉLIPIDÉES

Les investigations que nous avons exposées jusqu'ici ont toutes été conduites avec des sérums immuns totaux délipidés. Nous nous sommes demandé si le pouvoir inhibiteur dont nous avons étudié certaines modalités appartient à toutes les protéines immunes délipidées ou bien seulement à certaines d'entre elles. En d'autres termes, nous avons voulu savoir si tous les lipides que le sérum immun détient sur ses diverses fractions protéidiques sont également indispensables à l'obtention d'un précipité spécifique, ou bien si ce rôle ne relève que de certains d'entre eux rassemblés sur une fraction protéidique élective.

A. — Addition de fractions immunes homologues

Pour tenter de résoudre ce problème, nous avons pris les deux sérums immuns qui nous ont déjà servi au cours de nos précédentes recherches, c'est-à-dire le sérum de Cheval antitoxine diphtérique et le sérum de Lapin antipseudoglobulines de Cheval. Nous avons fractionné ces deux sérums en globulines, d'une part, albumines, d'autre part, au moyen du sulfate d'ammonium à demi-saturation. Nous avons vérifié que tous les anticorps précipitants se trouvaient rassemblés dans la fraction globulines, la fraction albuminique en étant tout à fait dépourvue. Enfin, nous avons délipidé chacune de ces fractions ainsi que du sérum entier et nous avons comparé l'influence inhibitrice de ces échantillons sur la vitesse de floculation de l'immunsérum homologue. Nous rapportons ici l'un de nos résultats pour chacun de nos deux systèmes immunologiques.

a) *Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval*

Nous prenons quatre séries de six tubes dans lesquels nous réalisons les mélanges suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5	6
Immunsérum normal dilué au 1/5 (cm³)	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75
Eau physiologique (cm³)	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0
Eau physiologique ou fraction immune délipidée diluée au 1/5 (cm³)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Anatoxine diphtérique (cm³)	1	1	1	1	1	1

Tous ces tubes sont portés au bain-marie et on note les durées de floculation consignées dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE FRACTIONS IMMUNES HOMOLOGUES DÉLIPIDÉES (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

	Tubes n°	1	2	3	4	5	6
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1.. Eau physiologique.	///	44	38	36	**34**	39
	Série n° 2.. Sérum total.....	98	85	86	**85**	97	///
	Série n° 3.. Globulines.....	126	114	**114**	116	126	///
	Série n° 4.. Albumines.....	///	45	39	**36**	37	41

On voit donc, par les résultats obtenus, que le sérum total et les globulines sont seuls doués de pouvoir inhibiteur, les albumines immunes délipidées en étant dépourvues. On ne peut s'empêcher de rapprocher cette opposition du fait que la fraction albuminique est la seule à être dépourvue d'anticorps, comme le montre d'ailleurs le déplacement du tube de primo-floculation avec les globulines et le sérum total et sa fixité dans le cas des albumines.

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous réalisons ici les quatre séries de mélanges suivantes :

Tubes n°	1	2	3	4	5
Sérum immun normal dilué au 1/8 (cm^3)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau physiologique ou fraction immune délipidée diluée au 1/8 (cm^3)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution de l'antigène (0,5 cm^3 par tube)	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024

Tous les tubes sont portés au bain-marie et on note les durées de floculation rapportées dans le tableau XIV,

TABLEAU XIV

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE FRACTIONS IMMUNES HOMOLOGUES DÉLIPIDÉES (SYSTÈME PSEUDO-GLOBULINES DE CHEVAL - ANTISÉRUM DE LAPIN).

Tubes n°		1	2	3	4	5
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1. Eau physiologique.	72	58	29	**26**	36
	Série n° 2. Sérum total.....	> 2 h.	2 h.	**35**	42	55
	Série n° 3. Globulines.....	> 2 h.	70	**38**	60	95
	Série n° 4. Albumines.....	> 2 h.	85	42	**35**	85

On voit que, dans le cas de ce système, toutes les fractions immunes délipidées inhibent la réaction de précipitation spécifique, même celles qui sont dépourvues d'anticorps précipitants comme la fraction albumines.

Afin de préciser une éventuelle corrélation entre la présence d'anticorps dans les échantillons délipidés étudiés et leur action inhibitrice sur la précipitation spécifique, nous avons repris ces essais, mais cette fois nous avons fractionné les globulines. Pour cela, au lieu de les précipiter en bloc par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, nous avons effectué une précipitation fractionnée des protéines en portant la concentration du milieu en sulfate d'ammonium d'abord au tiers puis à demi-saturation. Ceci nous a permis d'obtenir des euglobulines, des pseudoglobulines et des albumines [128].

Voici les résultats que nous avons obtenus avec les deux systèmes habituels :

a) *Système toxine diphtérique-immunsérum de Cheval*

Nous avons tout d'abord recherché l'existence d'anticorps précipitants dans les trois fractions définies ci-dessus. Nous en avons trouvé dans les euglobulines et dans les pseudoglobulines, mais les albumines en étaient dépourvues. Nous avons ensuite délipidé ces échantillons, les avons ramenés au même titre en protéines (il y avait plus de pseudoglobulines que d'euglobulines), puis nous avons réalisé les quatre séries de mélanges suivantes :

Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7
Immunsérum normal dilué au 1/5 (cm³)	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75
Eau physiologique (cm³).....	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0
Eau physiologique ou fraction immune délipidée diluée au 1/5 (cm³).....	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Anatoxine diphtérique (cm³)...	1	1	1	1	1	1	1

Ces différents mélanges ont été portés au bain-marie et nous avons noté les durées de floculation de chacun d'eux; le tableau XV indique les chiffres obtenus.

TABLEAU XV

Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition de fractions immunes homologues délipidées (système toxine diphtérique - antisérum de Cheval).

Tubes n°		1	2	3	4	5	6	7
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1.. Eau physiologique.	///	///	50	43	**42**	44	47
	Série n° 2.. Euglobulines.....	128	88	82	**82**	86	///	///
	Série n° 3.. Pseudoglobulines..	190	135	88	**86**	///	///	///
	Série n° 4.. Albumines.....	///	///	48	42	**40**	42	46

Ces résultats confirment donc ceux obtenus au cours de la série d'expériences précédente : seules les fractions immunes délipidées contenant des anticorps inhibent la précipitation spécifique.

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous avons répété les opérations décrites pour le système précédent. Notre recherche d'anticorps a été positive pour les euglobulines, mais négative pour les pseudoglobulines et les albumines. Ces différentes fractions (ainsi que du sérum total) ont été délipidées et ramenées au même titre en protéines.

Nous avons alors réalisé cinq séries de mélanges selon le protocole ci-après :

Tubes n°	1	2	3	4
Immunsérum normal dilué au 1/8 (cm³)	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau physiologique ou fraction immune délipidée diluée au 1/8 (cm³)	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution de l'antigène (0,5 cm³ par tube)	1/128	1/256	1/512	1/1024

Ces différents tubes sont portés au bain-marie et les durées de floculation sont les suivantes (tableau XVI) :

TABLEAU XVI

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE FRACTIONS IMMUNES HOMOLOGUES DÉLIPIDÉES (SYSTÈME PSEUDOGLOBULINES DE CHEVAL - ANTISÉRUM DE LAPIN).

Tubes n°		1	2	3	4
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1... Eau physiologique	50	24	**18**	26
	Série n° 2... Sérum total	**51**	53	59	78
	Série n° 3... Euglobulines	**51**	52	57	85
	Série n° 4... Pseudoglobulines	110	44	**42**	///
	Série n° 5... Albumines	110	49	**45**	67

Les résultats de l'expérience précédente se trouvent donc confirmés : dans le système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin, toutes les fractions immunes, même celles ne contenant pas d'anticorps précipitants, inhibent la précipitation spécifique.

Nous aboutissons ainsi à un résultat très différent de celui que nous avait fourni l'étude du sérum de Cheval antitoxine diphtérique. Avant de conclure, cependant, nous avons voulu, avec ce dernier système, voir s'il est possible de mettre en évidence une inter-relation entre le titre en anticorps et le pouvoir inhibiteur. Pour cela, nous avons fractionné le sérum

de Cheval antitoxine diphtérique au moyen du sulfate d'ammonium. Nous avons dosé les anticorps dans les fractions euglobulinique et pseudoglobulinique (nous avons trouvé respectivement 125 et 170 unités floculantes par centimètre cube de sérum de départ).

Nous avons dilué les pseudoglobulines pour les amener au même titre en anticorps que les euglobulines. Enfin, nous avons délipidé les trois fractions.

Nous avons alors réalisé quatre séries de mélanges dont rend compte le tableau ci-après :

Tubes n°	1	2	3	4	5	6
Sérum immun normal dilué au 1/5 (cm³)	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75
Eau physiologique (cm³)	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0
Eau physiologique ou fraction immune délipidée diluée au 1/5 dans le cas des euglobulines et pseudoglobulines, au 1/2 dans le cas des albumines (cm³)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Anatoxine diphtérique (cm³)	1	1	1	1	1	1

Les tubes sont portés au bain-marie et le tableau ci-dessous indique les durées de floculation observées (tableau XVII) :

TABLEAU XVII

Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition de fractions immunes homologues délipidées (système toxine diphtérique - antisérum de Cheval).

Tubes n°		1	2	3	4	5	6
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1.. Eau physiologique.	///	52	43	**39**	41	44
	Série n° 2.. Euglobulines.....	120	87	76	**72**	74	///
	Série n° 3.. Pseudoglobulines..	135	120	**105**	120	> 150	///
	Série n° 4.. Albumines.....	///	50	43	**39**	41	44

On voit donc, d'après ces résultats, que si dans le cas de ce système immunologique, seules les fractions délipidées contenant des anticorps inhibent le phénomène de précipi-

tation spécifique, il n'est pas pour autant possible d'établir un parallélisme entre titre en anticorps et pouvoir inhibiteur.

Nous constatons en effet que la fraction pseudoglobulinique du sérum, même ramenée au même titre en anticorps que la fraction euglobulinique, inhibe toujours davantage la floculation.

Ce fait rapproche les deux systèmes floculants que nous avons étudiés, mais le comportement de la fraction albumines les différencie nettement.

Est-il possible d'interpréter ce comportement différent des immunsérums de Lapin et de Cheval ?

Les récentes recherches effectuées sur le fractionnement des protéines sériques répondent peut-être à la question. Il est bien établi aujourd'hui que les anticorps migrent à l'électrophorèse avec les γ-globulines (Tiselius et Kabat [162]). Dans certains cas — et ceci se passe chez le Lapin —, une partie des anticorps migre avec les β-globulines. Or, ces dernières protéines se conduisent — par la technique de relargage au sulfate d'ammonium — comme des albumines. On conçoit donc que, chez le Lapin, la fraction albumines obtenue par relargage et délipidée puisse ralentir la floculation du système. Comment se fait-il donc que cette fraction albumines (non délipidée) n'ait pas révélé la présence d'anticorps précipitants ? Ce fait est évidemment difficile à expliquer : il laisse penser que l'on se trouve sans doute en présence d'anticorps incomplets selon la conception de Heidelberger.

B. — Addition de fractions non immunes ou hétérologues

Les résultats obtenus au cours de cette étude apportent des arguments en faveur de la théorie de Marrack. Ils montrent que les protéines délipidées ne peuvent interférer dans le phénomène de précipitation que si elles présentent l'empreinte de la spécificité du système étudié.

Toutes les expériences précédemment décrites ne peuvent avoir leur pleine signification que s'il est prouvé que les protéines non spécifiques ou non homologues, délipidées ou non, n'exercent aucune influence sur la floculation d'un système immunologique.

Dans ce but, nous avons réalisé un certain nombre d'expériences, dont nous décrirons seulement les principales, toutes ayant donné des résultats comparables.

Dans une première série de recherches, nous avons employé

des sérums entiers non immuns; nous avons effectué comparativement nos études sur nos deux systèmes immunologiques habituels.

a) *Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval*

Nous prenons sept séries de cinq tubes dans lesquels nous réalisons les mélanges suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5
Sérum immun normal dilué au 1/5 (cm³)	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75
Eau physiologique (cm³)	0,20	0,15	0,10	0,05	0
Eau physiologique ou sérum étudié dilué au 1/5 (cm³)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Anatoxine diphtérique (cm³)	1	1	1	1	1

Tous les tubes sont alors immergés au bain-marie à 37° C. Les temps de floculation que nous avons observés sont rassemblés dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII

Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition de sérum d'origine zoologique identique ou différente, non immun, délipidé ou non (système toxine diphtérique - antisérum de Cheval).

Temps de floculation (en minutes) — Tubes n°		1	2	3	4	5
Série n° 1	Eau physiologique	56	48	**44**	45	46
Série n° 2	Sérum de Cheval	55	44	**42**	44	46
Série n° 3	Sérum de Cheval délipidé	53	45	**43**	46	51
Série n° 4	Sérum de Poule	55	43	**40**	41	44
Série n° 5	Sérum de Poule délipidé	56	44	**41**	44	48
Série n° 6	Sérum de Lapin	52	46	**44**	45	52
Série n° 7	Sérum de Lapin délipidé	49	43	**42**	44	48

Ces résultats nous montrent qu'un sérum non immun délipidé ou non n'inhibe en aucun cas la réaction de précipitation spécifique.

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous prenons cinq séries de trois tubes dans lesquels nous préparons les mélanges ci-après :

Tubes n°	1	2	3
Sérum immun normal dilué au 1/4 (cm³)	0,5	0,5	0,5
Eau physiologique ou sérum étudié dilué au 1/4 (cm³)	0,5	0,5	0,5
Dilution de l'antigène (0,5 cm³ par tube)	1/32	1/64	1/128

Tous ces mélanges sont ensuite portés au bain-marie et nous avons noté les temps de floculation suivants, rapportés dans le tableau XIX :

TABLEAU XIX

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE SÉRUM D'ORIGINE ZOOLOGIQUE IDENTIQUE OU DIFFÉRENTE, NON IMMUN, DÉLIPIDÉ OU NON (SYSTÈME PSEUDOGLOBULINES DE CHEVAL - ANTISÉRUM DE LAPIN).

	Tubes n°	1	2	3
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1... Eau physiologique	29	**24**	29
	Série n° 2... Sérum de Lapin	31	**23**	27
	Série n° 3... Sérum de Lapin délipidé	29	**26**	30
	Série n° 4... Sérum de Poule	30	**28**	32
	Série n° 5... Sérum de Poule délipidé	30	**27**	32

Ces chiffres confirment donc ceux fournis par le système précédent : un sérum non immun même délipidé ne modifie pas de manière significative le temps de floculation d'un système précipitant.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons examiné quelle pouvait être l'influence non plus seulement de sérums

entiers, mais de fractions protéidiques provenant de ces sérums (euglobulines, pseudoglobulines et albumines) préparées par relargage à l'aide de sulfate d'ammonium [128]. Nous allons indiquer ici un des résultats que nous avons obtenus avec chacun de nos systèmes immunologiques.

a) *Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval*

Nous préparons neuf séries de mélanges réalisés conformément au tableau ci-après :

Tubes n°	1	2	3
Sérum immun normal dilué au 1/5 (cm³)	0,55	0,65	0,75
Eau physiologique (cm³)	0,20	0,10	0
Eau physiologique ou fraction protéidique diluée au 1/5 (cm³)	0,50	0,50	0,50
Anatoxine diphtérique (cm³)	1	1	1

TABLEAU XX

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE FRACTIONS DE MÊME ORIGINE ZOOLOGIQUE, NON IMMUNES, DÉLIPIDÉES OU NON (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Tubes n°		1	2	3
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1... Eau physiologique	70	**60**	63
	Série n° 2... Sérum de Cheval entier	68	**64**	66
	Série n° 3... Sérum de Cheval entier délipidé	70	**60**	62
	Série n° 4... Euglobulines de Cheval	68	**64**	66
	Série n° 5... Euglobulines de Cheval délipidées	68	**60**	60
	Série n° 6... Pseudoglobulines de Cheval.	69	**65**	66
	Série n° 7... Pseudoglobulines de Cheval délipidées	70	**60**	60
	Série n° 8... Albumines de Cheval	69	**65**	65
	Série n° 9... Albumines de Cheval délipidées	68	**61**	62

Nous avons placé tous nos tubes au bain-marie. Les durées de floculation de nos différents mélanges sont consignées dans le tableau XX.

Ces résultats montrent qu'aucune fraction protéidique non immune, qu'elle soit délipidée ou non délipidée, n'inhibe la précipitation spécifique. Nous avons obtenu exactement les mêmes résultats en remplaçant le sérum de Cheval ou les fractions protéidiques provenant du sérum de cette espèce par des sérums de mammifères (Lapin) ou d'oiseaux (Oie) ou par les fractions protéidiques isolées à partir de ces sérums, ce qui montre que l'origine zoologique des anticorps n'intervient pas.

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous préparons ici neuf séries de mélanges dont la composition est donnée par le tableau ci-après :

Tubes n°	1	2	3	4
Sérum immun normal dilué au 1/8 (cm³).	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau physiologique ou fraction protéidique diluée au 1/8 (cm³)	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution de l'antigène (0,5 cm³ par tube).	1/48	1/64	1/128	1/256

Nous avons ensuite placé tous nos tubes au bain-marie et noté les durées de floculation de nos différents mélanges dont rend compte le tableau XXI.

Nous voyons par conséquent, à la lumière de ces résultats, qu'aucune fraction protéidique non immune, délipidée ou non, n'inhibe de façon appréciable la précipitation spécifique du sérum de Lapin antipseudoglobulines de Cheval. Au cours d'expériences analogues, nous avons obtenu des résultats identiques en remplaçant le sérum de Lapin et les fractions protéidiques qui en dérivent par du sérum ou des fractions protéidiques provenant d'autres espèces animales, mammifères (Cheval) ou oiseaux (Oie).

Dans une troisième série d'essais, nous nous sommes demandé si l'action inhibitrice du sérum délipidé sur la précipitation spécifique devait être rattachée à la présence de

protéines immunes homologues. Pour répondre à cette question, nous avons étudié :

1° Le comportement du système floculant toxine diphtérique-antisérum de Cheval en présence de sérum de Cheval antitétanique ou de la fraction globulinique de ce sérum, délipidés ou non.

TABLEAU XXI

Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition de fractions de même origine zoologique, non immunes, délipidées ou non (système pseudoglobulines de Cheval - antisérum de Lapin).

	Tubes n°		1	2	3	4
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1...	Eau physiologique	67	42	**34**	62
	Série n° 2...	Sérum de Lapin entier.....	64	40	**31**	60
	Série n° 3...	Sérum de Lapin entier délipidé	69	42	**35**	64
	Série n° 4...	Euglobulines de Lapin.....	58	38	**30**	59
	Série n° 5...	Euglobulines de Lapin délipidées	71	45	**38**	66
	Série n° 6...	Pseudoglobulines de Lapin..	65	43	**36**	65
	Série n° 7...	Pseudoglobulines de Lapin délipidées	72	46	**40**	68
	Série n° 8...	Albumines de Lapin.....	70	47	**42**	68
	Série n° 9...	Albumines de Lapin délipidées	78	49	**44**	71

2° Le comportement du système floculant toxine tétanique-antisérum de Cheval en présence de sérum de Cheval antidiphtérique ou de la fraction globulinique de ce sérum, délipidés ou non.

Nous exposerons ces recherches en détail dans le chapitre III. Elles nous permettent de conclure que l'addition de fractions protéidiques immunes délipidées ou non, alors même que leur origine zoologique est identique à celle de l'anticorps, alors même qu'elles entrent dans la constitution d'un système immunologique voisin, n'inhibe en rien la précipitation spécifique de tout système floculant qui n'est pas rigoureusement homologue.

L'inhibition de la floculation que provoque la délipidation se trouve donc étroitement rattachée à la spécificité de l'anticorps.

VI. — ESSAIS DE RESTITUTION DES PROPRIÉTÉS FLOCULANTES AUX IMMUNSÉRUMS DÉLIPIDÉS

La perte du pouvoir floculant qui caractérise les anticorps délipidés est-elle réversible ? La première réponse à cette question a été négative : on s'est aperçu, en effet, que la simple restitution des lipides extraits à un immunsérum délipidé n'amène pas la réapparition des propriétés floculantes.

Cependant, Horsfall et Goodner [65] ont signalé que l'addition de lécithines à un sérum antipneumococcique de Cheval, ou de céphalines à un sérum antipneumococcique de Lapin, permet la réapparition de leurs propriétés floculantes (*). Comme nous l'avons signalé au cours de notre étude historique, ce phénomène est tout à fait exceptionnel : si, en effet, on réalise la synthèse de cénapses lécithines-protéines sériques antidiphtériques de Cheval délipidées (technique de Hofer), les propriétés floculantes de l'immunsérum ne réapparaissent pas (Pautrizel [121]).

Tayeau, M^lle Faure, Neuzil et Pautrizel [154] sont cependant parvenus à faire réapparaître les propriétés floculantes d'un sérum délipidé après action de la ninhydrine, mais l'expérience ne réussit que si l'immunsérum mis en œuvre provient du Lapin. Avec un sérum de Cheval, rien de semblable ne se produit.

Le comportement varié des divers sérums et les résultats discordants publiés sur ce sujet nous ont incité à reprendre cette question.

A. — Centrifugation

Krueger et Heidelberger [71] prétendent que si, après un certain laps de temps, on soumet à une centrifugation assez énergique le mélange antigène-anticorps délipidé, on voit réapparaître la floculation. Cette constatation conforme à la théorie de ces auteurs, selon laquelle les lipides constitueraient simple-

(*) L'effet produit par l'addition de lécithines ou de céphalines est inhibé par l'addition de cholestérol. Ceci s'explique par la formation de complexes lipides-lipides (phospholipides-cholestérol).

ment un ciment rapprochant les molécules d'antigène et d'anticorps, se montre assez peu compatible avec nos conceptions. Pour cette raison, nous avons étudié l'influence de la centrifugation sur les systèmes qui nous ont déjà servi dans notre étude préliminaire.

Dans une première série d'essais, nous avons étudié le système toxine diphtérique-antisérum de Cheval.

L'anticorps délipidé a été mis en présence d'une quantité d'antigène correspondant à la zone des proportions optima; le mélange placé à l'étuve à 37° C n'a pas floculé après vingt-quatre heures. Il est alors soumis pendant une heure à la centrifugation (5.000 tours/minute); aucune floculation n'apparaît dans ces conditions.

Le système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin délipidé, traité exactement de la même façon, n'a montré non plus aucune floculation.

Ces mélanges, reportés au bain-marie à 37° C, laissent, après vingt-quatre heures, apparaître un dépôt, mais il s'agit d'un précipité non spécifique dont nous ne saurions tenir compte.

Afin de préciser le rôle éventuel de la centrifugation, nous nous sommes adressé, dans une deuxième série d'expériences, à des mélanges de sérums immuns délipidés et non délipidés dont le temps de précipitation spécifique par l'antigène correspondant était mesurable.

Nous avons réalisé de nombreux essais faisant varier en particulier les proportions respectives de sérum immun délipidé et non délipidé, la durée de la centrifugation et le moment d'intervention de celle-ci après la mise en contact de l'antigène et des anticorps.

Voici un exemple de résultats obtenus avec le système toxine diphtérique-antisérum de Cheval. Nous déterminons tout d'abord les quantités d'antigène et d'anticorps correspondant à l'optimum immunologique, puis nous réalisons deux séries des mélanges suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5
Sérum immun normal dilué au 1/5 (cm³)	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2
Sérum immun délipidé dilué au 1/5 (cm³)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
Anatoxine diphtérique (cm³)	1	1	1	1	1

Les mélanges de l'une de ces deux séries sont soumis à une centrifugation de vingt minutes à 6.000 tours/minute, puis tous les tubes sont immergés au bain-marie.

Nous avons noté les durées de floculation ci-après (tableau XXII) :

TABLEAU XXII

INFLUENCE EXERCÉE PAR LA CENTRIFUGATION SUR LA VITESSE DE FLOCULATION (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Tubes n°		1	2	3	4	5
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1... Série non centrifugée.	30	38	55	100	5 h.
	Série n° 2... Série centrifugée.....	40	50	65	105	5 h. 20

On voit donc que la centrifugation n'a diminué le temps de floculation d'aucun mélange, mais les a même, au contraire, légèrement accrus.

Nous nous sommes alors demandé si cette influence négative de la centrifugation ne devait pas être rapprochée d'une modification de la zone des proportions optima ou d'un déplacement de l'optimum immunologique. Nous avons étudié ce point dans une troisième série d'expériences mettant en œuvre le même système (toxine diphtérique-antisérum de Cheval).

Nous réalisons deux séries des mélanges suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5
Sérum immun normal dilué au 1/5 (cm³)	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70
Eau physiologique (cm³)	0,20	0,15	0,10	0,05	0
Anatoxine diphtérique (cm³)	1	1	1	1	1

Les mélanges de l'une des séries sont centrifugés pendant dix minutes à 6.000 tours/minute et tous les tubes sont alors placés au bain-marie.

Le tableau XXIII indique les durées de floculation que nous avons observées.

TABLEAU XXIII

INFLUENCE EXERCÉE PAR LA CENTRIFUGATION SUR LA VITESSE DE FLOCULATION ET LA ZONE DES PROPORTIONS OPTIMA (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Tubes n°		1	2	3	4	5
Temps de floculation (en minutes)	Série n° 1... Série non centrifugée...	40	**35**	38	43	52
	Série n° 2... Série centrifugée.....	50	**38**	40	48	58

Ces résultats montrent que le retard noté dans la floculation sous l'influence de la centrifugation ne s'accompagne d'aucune modification dans la zone des proportions optima et en particulier de l'optimum immunologique. Ils ont été confirmés en tous points avec le système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin.

Enfin, dans une quatrième série de recherches, nous avons simultanément étudié le rôle de la centrifugation sur la vitesse de précipitation spécifique de systèmes contenant des anticorps délipidés et sur la zone des proportions optima. Voici un exemple des résultats que nous avons obtenus :

a) *Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval*

Nous avons tout d'abord préparé un mélange de sérum immun normal dilué au 1/5 : 4 parties; sérum immun délipidé dilué au 1/5 : 1 partie.

Puis nous avons réalisé deux séries des mélanges suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5
Mélange de sérums immuns (cm^3).	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70
Eau physiologique (cm^3).....	0,20	0,15	0,10	0,05	0
Anatoxine diphtérique (cm^3).....	1	1	1	1	1

L'une des séries est centrifugée pendant quinze minutes à 6.000 tours/minute, après dix minutes de repos à la température du laboratoire.

Puis tous les tubes sont immergés au bain-marie, et le tableau XXIV consigne les résultats donnés par la mesure de leur temps de floculation.

TABLEAU XXIV

INFLUENCE EXERCÉE PAR LA CENTRIFUGATION SUR LA VITESSE DE FLOCULATION ET LA ZONE DES PROPORTIONS OPTIMA (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Tubes n°		1	2	3	4	5
Temps de floculation (en minutes)	Série non centrifugée	130	102	**67**	83	115
	Série centrifugée	145	124	**72**	97	120

Tous nos résultats précédents se trouvent bien confirmés : dans nos conditions opératoires, la centrifugation ne fait pas floculer plus rapidement un complexe antigène-anticorps contenant des anticorps délipidés; la centrifugation ne modifie pas le phénomène de zone et ne déplace pas l'optimum immunologique.

b) *Système pseudoglobulines de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous préparons tout d'abord un mélange à parties égales de sérum immun normal dilué au 1/4 et du même sérum, mais délipidé, à la même dilution.

Puis nous réalisons deux séries des mélanges suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5
Mélange de sérums immuns (cm^3)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution de l'antigène (0,5 cm^3 par tube)	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256

L'une des séries est centrifugée pendant dix minutes à 5.000 tours/minute aussitôt après la préparation de ces mélanges, puis tous les tubes sont portés au bain-marie, et nous notons leur durée de floculation.

Nos résultats sont consignés dans le tableau ci-après (tableau XXV) :

TABLEAU XXV

INFLUENCE EXERCÉE PAR LA CENTRIFUGATION SUR LA VITESSE DE FLOCULATION ET LA ZONE DES PROPORTIONS OPTIMA (SYSTÈME PSEUDOGLOBULINES DE CHEVAL - ANTISÉRUM DE LAPIN).

Tubes n°		1	2	3	4	5
Temps de floculation (en minutes)	Série non-centrifugée	180	150	**125**	130	140
	Série centrifugée	190	185	**140**	145	155

Les conclusions de ces dernières expériences sont donc absolument identiques aux précédentes et montrent que la centrifugation — tout au moins avec les systèmes que nous avons étudiés et dans nos conditions expérimentales — ne permet pas à un système immunologique dont l'anticorps a été délipidé, de floculer.

B. — Addition de polymères hydrosolubles

Au cours de travaux antérieurs [105], nous avons montré que les polyoxyéthylène-glycols de poids moléculaire élevé (supérieur à 2.000) (*) sont susceptibles d'accélérer de façon considérable l'apparition d'un précipité spécifique sans modifier pour autant la spécificité des anticorps, à condition toutefois que la concentration en polyoxyéthylène-glycol ne dépasse pas une certaine valeur de l'ordre de 3 p. 100. On observe, d'autre part, un élargissement de la zone des proportions optima, soit du côté de la zone d'excès d'anticorps (β titration), soit du côté de la région d'excès d'antigène (α titration), c'est-à-dire toujours du côté de la zone la plus riche en protéines. Nous avons retrouvé cette action accélératrice avec tous les systèmes précipitants que nous avons étudiés quels que soient l'origine de l'anticorps (immunsérum de Cheval ou de Lapin), son état de pureté (immunsérum total ou frac-

(*) Les termes supérieurs des polyoxyéthylène-glycols de formule générale $CH_2OH — (CH_2 — O — CH_2)\ n — CH_2OH$ sont couramment désignés sous le nom de *Carbowax*, suivi d'un chiffre indiquant la valeur de leur poids moléculaire moyen.

tions globuliniques purifiées) et l'antigène employé (toxines et anatoxines, ovalbumine ou protéines sériques diverses). Ceci les oppose par conséquent à un autre agent parfois utilisé pour accroître la vitesse d'apparition du précipité spécifique, la ninhydrine ou hydrate de tricétohydrindène. Ce dernier réactif a été étudié en détail au point de vue immunitaire dans le laboratoire où nous travaillons [40]. Aussi, avons-nous pensé que les polymères seraient peut-être susceptibles de restituer à un immunsérum délipidé ses propriétés floculantes par addition en concentration convenable à un mélange d'anticorps délipidé et d'antigène.

Nos essais ont été réalisés avec du Carbowax 6.000 et un sérum de Cheval antitoxine diphtérique. Nous ne rapporterons ici qu'un seul de nos essais.

Dans cette expérience, nous avons pris deux séries d'échantillons du même sérum dilué au 1/5; la première série était constituée de sérum normal et la seconde de sérum délipidé. Nous avons ajouté à nos différents échantillons une solution à 10 p. 100 dans l'eau physiologique de Carbowax 6.000, de manière à obtenir une échelle de concentrations en Carbowax de 0 à 5 p. 100. Puis nous avons suivi l'évolution de l'aspect des solutions en fonction du temps au bain-marie à 37° C.

Le tableau XXVI rassemble nos résultats.

TABLEAU XXVI

Action exercée par le Carbowax 6.000, a différentes concentrations, sur le sérum de Cheval antitoxine diphtérique délipidé et non délipidé.

Tubes n°		1	2	3	4	5	6
Concentration en Carbowax 6.000 (en p. 100)		0	1	2	3	4	5
Aspect du sérum non délipidé	Immédiat	L	L	L	L	L	L
	Après 2 heures	L	L	L	L	L	O
Aspect du sérum délipidé	Immédiat	L	L	L	L	O	T
	Après 2 heures	L	L	L	O	T	P

(L = limpide; O = opalescent; T = trouble; P = précipité.)

Ces résultats montrent donc que le sérum de Cheval antidiphtérique délipidé est plus sensible à l'action précipitante du Carbowax 6.000 que le même sérum non délipidé.

Au cours de nos essais immunologiques, nous ne pourrons guère utiliser par conséquent une concentration en Carbowax supérieure à 3 p. 100 dans le mélange final (nous avons vérifié que l'anatoxine diphtérique ne manifeste aucune opalescence après addition d'un volume égal d'une solution à 10 p. 100 de Carbowax 6.000).

Nous avons réalisé deux séries des mélanges suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5
Sérum immun délipidé dilué au 1/5 (cm³)	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60
Eau physiologique (cm³)	0,20	0,15	0,10	0,05	0
Anatoxine diphtérique (cm³)	1	1	1	1	1
Eau physiologique ou solution de Carbowax 6.000 à 15 p. 100	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40

Ces mélanges sont ensuite placés au bain-marie à 37° C. Après vingt-quatre heures, la série qui a reçu du Carbowax présente une opalescence beaucoup plus marquée que la série témoin. On note même un léger dépôt au fond des tubes, mais ce précipité est pratiquement identique pour tous les mélanges de la gamme et son aspect fait beaucoup plus penser à une insolubilisation aspécifique sous l'influence du Carbowax qu'à une précipation spécifique.

En conclusion, avec le sérum de Cheval antidiphtérique délipidé dont nous nous sommes servi, l'adjonction de Carbowax 6.000 à la concentration de 3 p. 100 ne nous a pas permis d'assister à une récupération des propriétés floculantes.

Ce résultat pourrait paraître inattendu : si l'on admet — comme nous l'avons fait — que la délipidation amène simplement un retard de la floculation, on s'attendrait à voir le sérum délipidé récupérer ses propriétés floculantes sous l'influence des Carbowax, puisque ces substances activent la précipitation spécifique. La ninhydrine qui, elle aussi, active les propriétés floculantes des immunsérums de Lapin permet à ces derniers, une fois délipidés, de récupérer leurs propriétés floculantes !

Ceci peut s'expliquer, peut-être, à la lumière des travaux réalisés par TAYEAU et M^lle^ FAURE [154] d'une part, et par nous-même, d'autre part.

Lorsque l'on étudie l'effet exercé par la ninhydrine et par le Carbowax 6.000 sur la vitesse de formation de l'agrégat antigène-anticorps, on s'aperçoit que l'effet produit par le premier réactif est beaucoup plus intense que celui exercé par le second. C'est éventuellement à cette différence quantitative d'action qu'il faudrait rattacher nos observations.

Tous ces essais permettent de conclure qu'il est extrêmement difficile de restituer à un immunsérum précipitant délipidé son pouvoir floculant. Le cas du sérum antipneumococcique, étudié par HORSFALL et GOODNER, et celui des immunsérums de Lapin traités par la ninhydrine, ne sauraient être généralisés. Pour pouvoir restituer à l'immunsérum délipidé ses propriétés floculantes, il faudrait arriver à bloquer les groupements basiques sur lesquels était justement fixée la micelle lipidique; on se rend aisément compte combien une telle opération pose de problèmes.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Dans ce premier chapitre, nous avons exposé et discuté les différentes méthodes utilisées pour la délipidation sans dénaturation du sérum. Des essais comparatifs nous ont amené à opter pour la méthode de HARDY et GARDINER.

L'étude systématique de l'action exercée par la délipidation du sérum anticorps dans la floculation spécifique nous a conduit à un certain nombre de conclusions.

1° Suivant les systèmes étudiés, le retard de la floculation provoqué par la délipidation du sérum peut être très variable et osciller entre quelques minutes et l'infini. Dans la plupart des cas, la délipidation du sérum retarde tellement la floculation qu'il est impossible de savoir si le dépôt qui se forme à la longue est dû à une précipitation spécifique ou à la dénaturation des protéines.

2° Le retard apporté à la floculation est proportionnel à la richesse de l'immunsérum en protéines délipidées.

3° Le complexe antigène-anticorps délipidé est très nettement moins stable que le complexe témoin antigène-anticorps non délipidé et se décompose très facilement. L'avidité de l'antigène pour l'anticorps délipidé est bien moindre que

pour l'anticorps non délipidé. Cette constatation permet d'expliquer le changement apparent du titre en anticorps précipitants observé dans les sérums délipidés.

4° Le complexe antigène-anticorps normal commence à se former dès que les constituants se trouvent en présence; il est pratiquement formé lorsque s'est écoulé un temps égal à la moitié de celui nécessaire à la floculation; on comprend qu'à partir de ce moment l'addition au milieu de sérum délipidé neutralisé ou non n'exerce pratiquement plus d'influence.

5° Nous avons montré encore que le pouvoir inhibiteur exercé par le sérum délipidé est bien un phénomène spécifique, car l'addition de sérum ou de fractions protéidiques délipidées non immunes ou non homologues n'exerce aucune influence sur la floculation.

Nous avons enfin discuté de diverses techniques permettant la restitution à un sérum délipidé de son pouvoir floculant et nous avons montré que celle-ci ne peut être obtenue que dans des cas exceptionnels.

CHAPITRE II

MISE EN ÉVIDENCE DES COMPLEXES ANTIGÈNE-ANTICORPS DÉLIPIDÉ

Toutes les expériences décrites dans le précédent chapitre montrent que l'immunsérum privé de ses lipides conserve sa spécificité. Ce phénomène avait d'ailleurs été signalé, il y a bien longtemps, par HARDY et GARDINER [48] qui avaient montré que l'antitoxine diphtérique délipidée conserve le pouvoir de neutraliser la toxine.

Aucun auteur, à notre connaissance, n'a tenté de mettre en évidence, autrement que par des techniques biologiques sur l'animal même (technique d'EHRLICH, technique de JENSEN [voir 121]), les propriétés spécifiques du sérum délipidé. Nous avons cherché à le faire et nous avons mis en œuvre :

1° L'analyse capillaire sur papier;

2° L'électrophorèse sur papier;

3° La diffusion latérale de la lumière.

Cette dernière technique nous a permis en outre de suivre l'évolution de la combinaison antigène-anticorps et de vérifier diverses hypothèses que nous avons échafaudées dans le précédent chapitre.

I. — ANALYSE CAPILLAIRE SUR PAPIER

Cette technique a été appliquée à la réaction antigène-anticorps par CASTANEDA [17] (*). Grâce à elle, cet auteur a

(*) CASTANEDA [17] et SPALDING et METCALF [141] désignent cette méthode par le terme de chromatographie sur papier. Cette dernière dénomination peut prêter quelque peu à confusion, car on réserve habituellement ce terme à la technique de séparation fondée sur la différence des coefficients de partage dans un système diphasique de deux ou plusieurs solvants; or, ce n'est pas le cas ici.

pu mettre en évidence des réactions d'agglutination intéressant les *Brucella*. Plus tard, Spalding et Metcalf [141] l'ont appliquée à l'agglutination des *Salmonella*.

Nous avons pensé que la réaction de précipitation spécifique devait, elle aussi, être justiciable de cette technique, et nous avons réalisé des essais dans ce but. Nos expériences ont été couronnées de succès.

Notre technique consiste à placer vers l'extrémité de la feuille servant à la « chromatographie » une goutte de liquide contenant l'antigène et à lui superposer une goutte de solution d'anticorps, puis à soumettre le papier au développement en

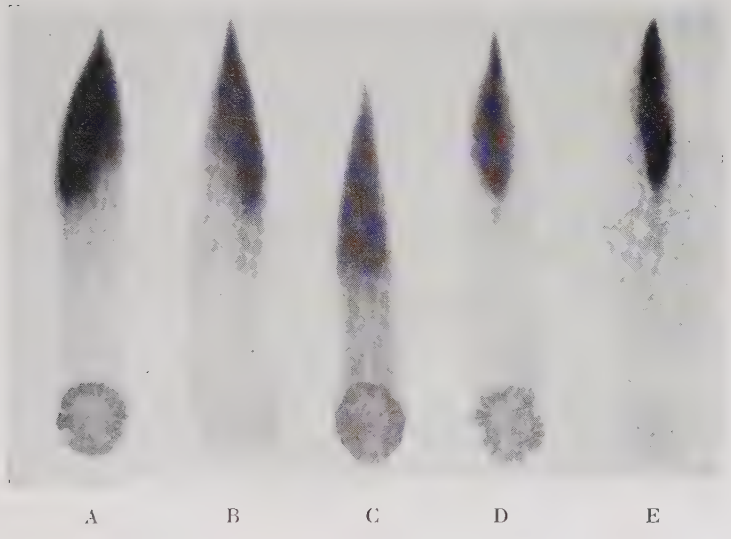

Fig. 7.

Mise en évidence, par analyse capillaire sur papier, de la combinaison antigène-anticorps délipidé.

A, mélange toxine diphtérique - antisérum de Cheval (zone des proportions optima);
B, mélange toxine diphtérique - sérum de Cheval ordinaire;
C, mélange toxine diphtérique - antisérum de Cheval délipidé;
D, mélange toxine diphtérique - globulines antidiphtériques de Cheval;
E, mélange toxine diphtérique - sérum de Cheval antitétanique.

utilisant comme phase solvante l'eau physiologique. Si l'antigène et l'anticorps se correspondent, il se produit une tache qui ne migre pas et qui reste localisée sur la ligne de départ. Cette tache peut être aisément révélée par coloration à l'amidoschwarz ou au bleu de bromophénol (fig. 7, A et D). Si, au

contraire, l'antigène et l'anticorps ne sont pas homologues, chaque constituant migre pour son propre compte (fig. 7, B et E). Nous avons réalisé des essais en mettant en œuvre de l'immunsérum délipidé; dans ces conditions, on observe bien la tache du point de départ, témoin d'une combinaison entre l'antigène et l'anticorps délipidé (fig. 7, C). Il est donc possible, grâce à l'analyse capillaire sur papier, de mettre en évidence la combinaison antigène-anticorps délipidé. Nous avons essayé de rendre la réaction quantitative, mais nos résultats ne se sont pas montrés suffisamment nets pour que l'on puisse en tenir compte en vue d'applications pratiques, telles que la titration d'immunsérums délipidés par exemple. Cependant, la grande sensibilité de cette technique, ainsi que le fait qu'elle donne encore des résultats nets lorsqu'antigène et anticorps sont superposés en proportions relativement éloignées de celles de l'optimum, permettent de l'utiliser avec des solutions pauvres en anticorps, délipidé ou non.

II. — ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER

Machebœuf, Rebeyrotte, Dubert et M[lle] Brunerie [93] ont réalisé une étude concernant la microélectrophorèse sur papier avec évaporation continue du solvant, ce qui les a conduits à émettre diverses lois : chaque type électrophorétique de protéines se trouve transporté, puis stocké en un point différent caractéristique; la position définitive d'une protéine est indépendante de sa position initiale et de la durée d'expérience, à condition que cette durée ait été suffisante pour que l'équilibre soit atteint.

Il est donc possible de trouver pour deux protéines de mobilité différente deux points de départ sur une même piste tels que pendant leur trajet les protéines se croisent; si ces protéines réagissent l'une sur l'autre, il se produira une tache se comportant différemment des taches de protéines non réagissantes et qui permettra de conclure qu'il y a eu réellement combinaison.

Nous avons appliqué cette technique aux immunsérums délipidés.

Pour cela, nous plaçons sur une feuille de papier pour électrophorèse, une goutte (8 μ l) de l'immunsérum à étudier, tandis que l'antigène est déposé sur la même piste au niveau normalement occupé, en fin d'électrophorèse, par la fraction albumines. L'électrophorèse est réalisée pendant cinq heures

à *p*H 8,6, avec un tampon véronal acide-véronal sodé, sous 300 volts et 5 milliampères. En fin d'opération, la feuille est immergée dans une solution de bleu de bromophénol ou d'amidoschwarz qui révèle les fractions protéidiques.

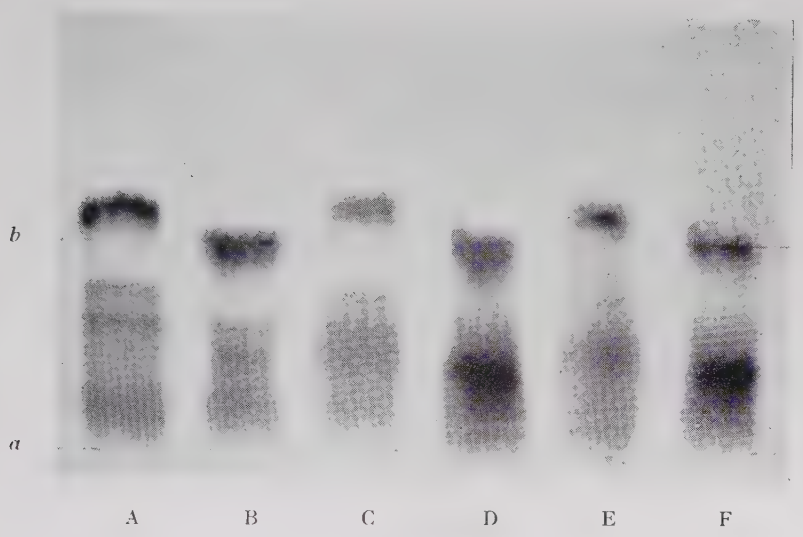

Fig. 8.

Mise en évidence, par électrophorèse sur papier, de la combinaison antigène-anticorps délipidé.

A, sérum de Cheval ordinaire;
B, sérum de Cheval ordinaire et toxine diphtérique;
C, sérum antidiphtérique de Cheval (*);
D, sérum antidiphtérique de Cheval et toxine diphtérique;
E, sérum antidiphtérique de Cheval délipidé;
F, sérum antidiphtérique de Cheval délipidé et toxine diphtérique;
a, ligne de dépôt des sérums;
b, ligne de dépôt de la toxine diphtérique.

Si l'antigène et l'anticorps correspondent entre eux, on aperçoit une tache à mi-chemin environ entre les points de départ des deux agents réagissants (fig. 8, D). Lorsque le sérum mis en œuvre ne correspond pas à l'antigène utilisé, cette tache ne se produit pas (fig. 8, B). Nos expériences,

(*) L'aspect inaccoutumé du diagramme électrophorétique du sérum de Cheval antidiphtérique correspond aux diagrammes des sérums vieillis [voir 151].

réalisées avec le sérum de Cheval antidiphtérique délipidé, montrent qu'il est possible de mettre en évidence, par l'électrophorèse sur papier, les propriétés anticorps du sérum délipidé (fig. 8, F). En général, cette technique donne des résultats moins nets que l'analyse capillaire sur papier, tout au moins lorsque les proportions d'antigène et d'anticorps se trouvent éloignées de l'optimum immunologique.

III. — DIFFUSION LATÉRALE DE LA LUMIÈRE

C'est à Lord Rayleigh que l'on doit cette technique : cet auteur a montré qu'il existe une relation entre l'intensité de la lumière diffusée et le diamètre et le nombre des particules diffusantes; il a défini par la suite les conditions qu'il convient de remplir si l'on veut opérer sur les milieux biologiques (*). D'autres études, réalisées en particulier par Dognon, Pokrowsky, Lange, Putzeys, Doty, Haurowitz... ont permis d'appliquer cette technique à l'étude des protéines.

L'union entre l'antigène et l'anticorps correspondant à la formation d'agrégats, on comprend tout l'intérêt de cette technique pour l'étude de la réaction antigène-anticorps. Aussi plusieurs recherches sur ce sujet parurent-elles simultanément et en particulier celles de Goldberg et Campbell [45] et de Gitlin et Edelhoch [44] qui furent publiées à peu près en même temps que les nôtres (**).

Dans nos essais, nous n'avons pas mesuré la taille des complexes antigène-anticorps formés, ne disposant pas encore de l'appareil nécessaire pour cette mesure. Nous avons mis en œuvre le diffuso-absorptiomètre de Dognon, qui ne permet pas d'obtenir des valeurs absolues, mais avec lequel on peut effectuer des mesures comparatives.

Nos expériences ont consisté à placer dans la cuve de l'appareil les « réactifs » à étudier et à mesurer, en fonction du temps, la lumière diffusée : les lectures sont exprimées en dixièmes de microampères et correspondent à l'intensité du courant débité par la cellule de l'appareil (lumière diffusée à 90° par rapport à la direction de propagation du rayon lumineux).

Tous nos travaux ont été réalisés avec le système toxine

(*) On trouvera d'intéressants détails sur cette question dans une revue de Canals, *Tunisie Médicale*, 1951, **29**, 859.

(**) Prise de date : IIe Congrès international de Biochimie, Paris, 1952.

TABLEAU XXVII

INFLUENCE DE LA DÉLIPIDATION DE L'IMMUNSÉRUM SUR L'INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE LATÉRALEMENT AU COURS DE LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Temps (en minutes).	1/2	1	1¼	2	3	5	10	15	20	30	45	60	75	90	2 h.	3 h.
Intensité de la lumière diffusée latéralement — Témoin (sérum immun normal)	19	23	27	29	33	36	41	43	44	45	46	48	49	50 Fl.		
Intensité de la lumière diffusée latéralement — Sérum immun délipidé	15	16	17	17	18	19	21	23	24	26	28	29		31	33	35

(Fl. = floculation.)

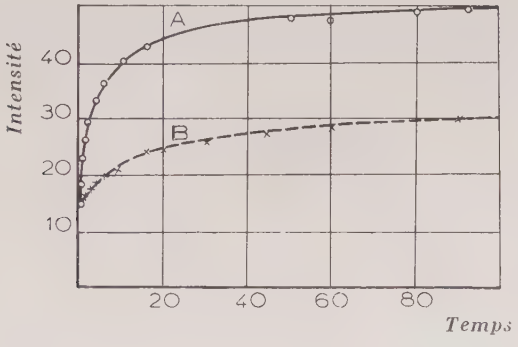

FIG. 9.

Courbes représentatives des intensités de la lumière diffusée latéralement en fonction du temps (en minutes).

A, sérum immun normal;

B, sérum immun délipidé.

diphtérique-antisérum de Cheval (2,5 cm³ de toxine et 1,5 cm³ d'antisérum dilué au 1/5 correspondent à l'optimum immunologique).

Nos premiers essais ont consisté à comparer la lumière diffusée par le mélange (réalisé au temps zéro) toxine diphtérique-antisérum de Cheval et par le même mélange, dans lequel l'anticorps a été préalablement délipidé.

Nos résultats, auxquels correspondent les courbes de la fig. 9, sont consignés dans le tableau XXVII.

Ces résultats apportent un argument en faveur de l'hypothèse qui nous a servi de base à l'interprétation des expériences du chapitre premier : les agrégats antigène-anticorps

TABLEAU XXVIII

INFLUENCE DE LA DÉLIPIDATION PARTIELLE DE L'IMMUNSÉRUM SUR L'INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE LATÉRALEMENT AU COURS DE LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

	Temps (en minutes) . . .	1/2	1	1 ½	2	3	5	10	15	20	30	45	60	75	90	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.
Intensité de la lumière diffusée latéralement	Sérum immun normal	19	23	27	29	33	36	41	43	44	45	46	48	49	50 Fl.				
	Mélange de sérums immuns normal et délipidé	16	18	20	21	23	28	34	38	40	43	46	47			50	51	52	53 Fl.

(Fl. = floculation.)

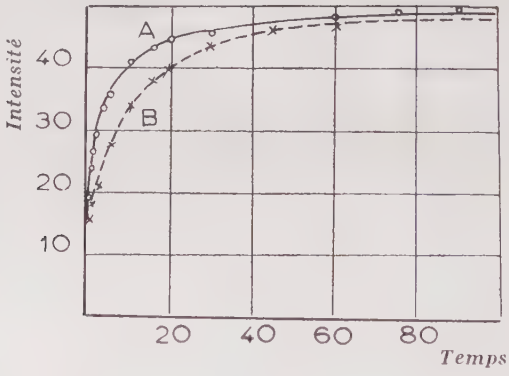

FIG. 10.

Courbes représentatives des intensités de la lumière diffusée latéralement en fonction du temps (en minutes).

A, sérum immun normal;

B, mélange de sérums immuns normal et délipidé.

délipidé mettent beaucoup plus de temps à atteindre une taille déterminée que les agrégats témoins (antigène-anticorps normal). La réaction antigène-anticorps est donc beaucoup plus rapide lorsque le sérum n'a pas été délipidé : l'avidité

du sérum normal pour l'antigène est plus grande que celle du même sérum délipidé.

Dans une seconde série de recherches, nous avons étudié comparativement la lumière diffusée par le mélange antigène-anticorps normal et celle diffusée par le même mélange dont une portion seulement de l'anticorps avait subi la délipidation : de cette façon, la floculation peut encore se produire.

Le mélange utilisé renferme trois parties de sérum immun normal et une partie de sérum immun délipidé. Nos résultats sont indiqués dans le tableau XXVIII; ils sont concrétisés par les courbes de la figure 10.

Ces courbes, qui confirment les conclusions de la première expérience, prouvent en outre que les agrégats constitués avec un immunsérum délipidé se montrent, à taille égale, beaucoup plus solubles que ceux formés avec un immunsérum normal seul.

Ces diverses constatations mettent bien en évidence les modifications apportées à « la balance hydrophile-lipophile » par la délipidation. Elles montrent le rôle joué par les fonc-

TABLEAU XXIX

INFLUENCE EXERCÉE PAR L'ADDITION, APRÈS DES TEMPS VARIABLES, D'IMMUNSÉRUM HOMOLOGUE NON DÉLIPIDÉ SUR L'INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE LATÉRALEMENT AU COURS DE LA RÉACTION ANTIGÈNE - ANTICORPS (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Intensité de la lumière diffusée latéralement	Temps (en minutes)..	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90
	Témoin..	19	24	28	32	33	36	7	37	38*	39	39	40	38	38							
	Addition de sérum immun normal dilué au 1/5 après (en minutes) 0	22	4	26	27	29	35	38	41	42	42	44	45	45	46	48	48	49	49	49	49	19*
	1	20	34	39	40	41	45	46	48	48	48	50	52	52	52						*	
	2	22	27	42	43	47	50	52	52	54	54	54	56	55	56	56	56	57	*		60	54
	4	20	25	29	30	42	49	50	52	52	53	53	53	53	53	53	53	53*	53	54	54	54
	9	17	23	27	29	30	46	48	52	52	*											

L'astérisque indique le moment où se produit la floculation. Les durées de floculation pour les différents mélanges sont les suivantes :

Témoin ..... 24 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 ajouté au temps 0..... 2 heures environ.
Sérum immun normal dilué au 1/5 ajouté après 1 minute..... 85 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 ajouté après 2 minutes..... 70 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 ajouté après 4 minutes..... 65 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 ajouté après 9 minutes..... 30 minutes.

tions hydrophobes dans la formation des agrégats et l'importance, dans l'insolubilité du floculat, du rapport

$$\frac{\text{nombre de fonctions hydrophiles restées libres}}{\text{volume de l'agrégat}}.$$

Ces constatations confirment les hypothèses que nous avons émises dans la première partie de notre travail.

TABLEAU XXX

Influence exercée par l'addition, après des temps variables, d'immunsérum homologue délipidé sur l'intensité de la lumière diffusée latéralement au cours de la réaction antigène - anticorps (système toxine diphtérique - antisérum de Cheval).

Temps (en minutes)..		1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	70	90	120
Intensité de la lumière diffusée latéralement	Témoin.....	19	27	31	33	35	39	40	42	42										
	Addition de sérum immun délipidé dilué au 1/5 après (en minutes) 0	16	18	20	22	23	30	32	35	39	40	41	41	42	42	45	45	47	49	52
	1	19	31	35	36	38	42	44	46	48	48	50	50	50	51	52	52	52	52	
	2	17	22	35	38	40	46	48	49	50	51	52	52	53		54		56	54	56
	4	23	31	35	37	45	50	55	57	57		59			59	59		59		61
	9	20	29	33	36	38	47	55	57	57	57	57	58	58	58	58	58	58	58	58

Sauf dans le témoin, on n'observe ici aucune floculation.

Dans une troisième série de travaux, nous avons encore étudié l'influence exercée par l'addition au système floculant, après des temps de contact variés, de sérum immun normal, de sérum immun délipidé, ou de complexe antigène-anticorps.

Les résultats que nous avons obtenus dans le cas de l'addition du sérum normal (addition de 1 cm³ de sérum immun dilué au 1/5 à un mélange de toxine diphtérique et d'antisérum de Cheval à l'optimum immunologique) sont indiqués dans le tableau XXIX.

Le tableau XXX rassemble les résultats obtenus dans le cas de l'addition du même sérum délipidé.

Le premier de ces deux tableaux montre que l'addition de sérum immun homologue retarde la formation de l'agrégat (par déplacement du titre vers l'excès d'anticorps). Le retard est d'autant plus marqué que l'addition a été plus précoce. Cette observation met en évidence la relative stabilité du

complexe antigène-anticorps déjà formé, que nous avons déjà signalée antérieurement (voir p. 57).

On observe encore que, dans un cas comme dans l'autre, l'addition du sérum provoque une nette augmentation de la

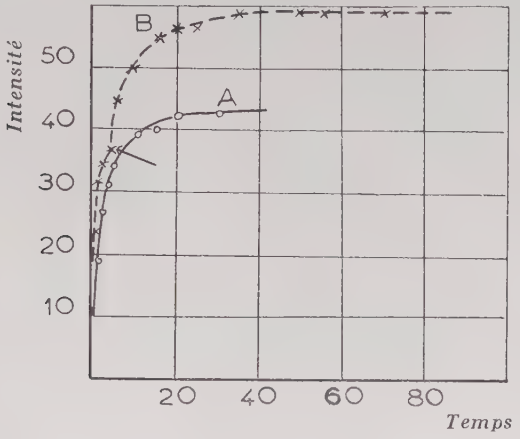

Fig. 11.

Courbes représentatives des intensités de la lumière diffusée latéralement en fonction du temps (en minutes).

A, sérum immun normal;

B, addition, après quatre minutes, de sérum immun délipidé (la flèche indique cette addition).

lumière diffusée latéralement. La courbe de la fig. 11 rend compte de ce phénomène dans le cas du sérum délipidé ajouté après quatre minutes.

Ce phénomène s'explique à la lumière de travaux anciens [74, 83, 21, 80] et des nôtres. Lorsque l'antigène et l'anticorps se trouvent en présence, ces deux constituants entrent rapidement en combinaison, mais la vitesse de combinaison diminue avec le temps. Lorsque l'antigène et l'anticorps sont en contact depuis déjà quelques minutes, l'addition de l'excès d'anticorps amène une rapide combinaison de ce dernier avec l'antigène non encore entré en réaction : la courbe représentative de la lumière diffusée latéralement acquiert de nouveau l'aspect de celle obtenue immédiatement après le mélange de l'antigène et de l'anticorps. La courbe réalisée est en quelque sorte la résultante de la lumière diffusée par les deux combinaisons antigène-anticorps à des stades différents.

Cette courbe atteint d'autre part un maximum plus élevé que la courbe témoin, car la concentration du milieu en protéines est nettement plus grande.

Si, au lieu d'ajouter un excès d'anticorps, on ajoute au milieu le mélange neutralisé antigène-anticorps (*), on observe le phénomène inverse. La courbe obtenue est ici encore la résultante de deux phénomènes : une réaction antigène-anticorps non terminée (système en cours de floculation) et une réaction antigène-anticorps déjà très avancée ou même complètement terminée (système ajouté).

Voici les valeurs obtenues pour l'addition du complexe antigène-immunsérum normal (tableau XXXI) :

TABLEAU XXXI

INFLUENCE EXERCÉE PAR L'ADDITION, APRÈS DES TEMPS VARIABLES, DU COMPLEXE ANTIGÈNE - IMMUNSÉRUM NORMAL SUR L'INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE LATÉRALEMENT AU COURS DE LA RÉACTION ANTIGÈNE - ANTICORPS (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Temps (en minutes)..		1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Intensité de la lumière diffusée latéralement	Témoin.....	19	25	28	30	33	36	38	38	39*				
	Addition de sérum immun normal dilué au 1/5 et neutralisé après (en minutes) 0	13	17	20	22	23	26	27	31	32	32*	32	32	33
	1	18	19	21	23	27	29	31	32	32*				
	2	19	25	24	24	25	28	29	32	32*	32	32		
	4	18	25	28	30	26	31	31	32*	32	32			
	9	17	23	27	30	31	29	29	30*	31	31	32	32	32

L'astérisque indique le moment où se produit la floculation.

Les durées de floculation des différents mélanges sont les suivantes :

Témoin ..... 25 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 et neutralisé ajouté au temps 0 ..... 30 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 et neutralisé ajouté après 1 minute ..... 26 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 et neutralisé ajouté après 2 minutes ..... 26 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 et neutralisé ajouté après 4 minutes ..... 22 minutes.
Sérum immun normal dilué au 1/5 et neutralisé ajouté après 9 minutes ..... 22 minutes.

(*) Dans le cas du système non délipidé, nous ajoutons la fraction non floculée obtenue par centrifugation du mélange antigène-anticorps après un temps de contact suffisant.

Dans le cas du système délipidé, nous ajoutons le mélange antigène-anticorps laissé en contact pendant dix-huit heures.

TABLEAU XXXII.

INFLUENCE EXERCÉE PAR L'ADDITION, APRÈS DES TEMPS VARIABLES, DU COMPLEXE ANTIGÈNE - IMMUNSÉRUM DÉLIPIDÉ SUR L'INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE LATÉRALEMENT AU COURS DE LA RÉACTION ANTIGÈNE - ANTICORPS (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Temps (en minutes)..		1	2	3	4	5	10	15	20	30	40	50	60
Intensité de la lumière diffusée latéralement — Témoin.....		19	25	28	33	35	39	40	42*				
Intensité de la lumière diffusée latéralement — Addition de sérum immun délipidé dilué au 1/5 et neutralisé après (en minutes)	0	23	29	33	35	36	40		43			44	44*
	1	23	27	31	32	34	38	40	41	41	42	42	43*
	2	23	33	32	33	34	40		41	42	43	44*	44
	4	27	36	42	43	38	40		43	43	43*	43	
	9	26	35	39	42	43	40	42	42	43	43*	43	43

L'astérisque indique le moment où se produit la floculation.

Les temps de floculation des différents mélanges sont les suivants :

Témoin ..... 24 minutes.
Sérum immun délipidé dilué au 1/5 et neutralisé ajouté au temps 0 ..... 65 minutes.
Sérum immun délipidé dilué au 1/5 et neutralisé ajouté après 1 minute ..... 58 minutes.
Sérum immun délipidé dilué au 1/5 et neutralisé ajouté après 2 minutes ..... 55 minutes.
Sérum immun délipidé dilué au 1/5 et neutralisé ajouté après 4 minutes ..... 45 minutes.
Sérum immun délipidé dilué au 1/5 et neutralisé ajouté après 9 minutes ..... 42 minutes.

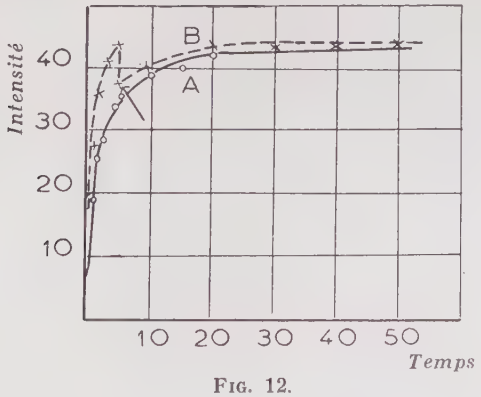

FIG. 12.

Courbes représentatives des intensités de la lumière diffusée latéralement en fonction du temps (en minutes).

A, sérum immun normal;

B, addition, après quatre minutes, du complexe antigène - sérum immun délipidé (la flèche indique cette addition).

Les chiffres obtenus dans le cas de l'addition du complexe antigène-immunsérum délipidé sont rapportés dans le tableau XXXII.

Les courbes de la fig. 12 rendent compte du phénomène (cas de l'addition du système délipidé).

Bien d'autres conclusions doivent être encore tirées des études mettant en œuvre la diffusion latérale de la lumière. Les conditions dans lesquelles nous avons dû opérer (lumière diffusée à 90° par rapport à la direction de propagation du rayonnement incident) limitent cependant beaucoup les possibilités d'interprétation des phénomènes et commandent la prudence : seules des comparaisons peuvent être tentées.

Lorsque nous pourrons reprendre notre étude avec un appareil permettant de mesurer la lumière diffusée à 20° ou 25°, nous étudierons systématiquement la réaction antigène-anticorps à la zone des proportions optima, comme en présence d'un excès d'antigène ou d'anticorps délipidé ou non. Il est fort possible qu'à ce moment, nous soyons amené à modifier quelque peu la théorie de Marrack qui, jusqu'à nouvel ordre, est de toute les théories sur la précipitation antigène-anticorps, celle qui correspond le mieux à nos conceptions.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Grâce à l'analyse capillaire sur papier, à l'électrophorèse sur papier et à la diffusion latérale de la lumière, nous sommes parvenu à mettre en évidence la réaction antigène-anticorps délipidé.

Une étude systématique de la lumière diffusée par le mélange antigène-anticorps délipidé ou non en fonction du temps nous a permis d'aboutir à diverses conclusions :

1° L'antigène se combine beaucoup moins rapidement avec l'anticorps délipidé qu'avec l'anticorps normal.

2° Les agrégats antigène-anticorps partiellement délipidé, doivent, pour floculer, atteindre une taille beaucoup plus grande que les agrégats témoins antigène-anticorps non délipidé.

Ces faits confirment les hypothèses que nous avions émises dans le premier chapitre de notre travail.

CHAPITRE III

APPLICATION DES RECHERCHES PRÉCÉDENTES A LA DÉMONSTRATION DU CARACTÈRE SPÉCIFIQUE DE LA SECONDE PHASE DANS LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION

Nous avons rappelé, dans le premier chapitre de notre étude historique, que, selon Bordet [9, 10], il convient de considérer deux phases dans la réaction de précipitation spécifique :

Première phase : combinaison de l'antigène et de l'anticorps, phase rapide commençant dès que les constituants du complexe se trouvent en présence.

Deuxième phase : précipitation, encore désignée sous le nom de floculation et due, selon Bordet [10], à l'agrégation des complexes antigène-anticorps formés au cours de la première phase. La formation des agrégats, nous l'avons également signalé, doit être rattachée à une diminution relative des forces d'affinité pour l'eau (due à la combinaison antigène-anticorps) au profit des forces de cohésion (Bordet [10], Boyd [13]).

On a beaucoup discuté — et nous avons eu l'occasion de le rappeler dans la première partie — pour savoir si la deuxième phase était due, comme la première, à l'intervention de forces spécifiques : Bordet [10] estime que la précipitation elle-même représente un phénomène physique lié aux forces non spécifiques. Marrack [97] et Heidelberger [52] ne partagent pas du tout ce point de vue et émettent des théories selon lesquelles le phénomène de précipitation doit être rattaché

uniquement à la taille de l'agrégat antigène-anticorps et aux fonctions hydrophiles restées libres, les constituants de l'agrégat, antigène et anticorps, étant unis par les seules forces spécifiques.

Par des expériences portant sur diverses réactions d'agglutination, on a tenté de résoudre ce problème. Le principe des recherches effectuées dans ce domaine consiste à mettre en présence deux systèmes agglutinants différents et à observer les flocons formés. Signalons à ce sujet l'intéressante expérience réalisée par Topley, Wilson et Duncan [163] : étudiant l'agglutination dans un mélange contenant deux antigènes différents, bactéries et hématies, et les antisérums agglutinants correspondants, ces auteurs ont observé la formation de deux types de flocons différents, les uns renfermant des bactéries, les autres des hématies. Cette observation semblait donc prouver la spécificité du deuxième temps de la réaction d'agglutination.

Abramson [1] réalisait cependant une expérience conduisant à la conclusion inverse : il montrait que, si l'on renouvelait le précédent essai en mettant en œuvre cette fois du bacille de Friedlander et des hématies avec leurs anticorps respectifs, il se formait des flocons mixtes, signant le manque de spécificité du deuxième temps de la réaction d'agglutination.

Plus tard, Hooker et Boyd [62], opérant sur des mélanges de globules humains et aviaires en présence des agglutinines correspondantes, observaient, eux aussi, la présence de flocons mixtes.

A la suite de toutes ces recherches, il était difficile de conclure, et des doutes subsistaient sur la spécificité de la deuxième phase de la réaction d'agglutination.

Wiener et Herman [169] ont alors réalisé toute une série d'expériences du même type; les nombreux essais qu'ils ont effectués les ont amenés à conclure que l'existence de flocons mixtes constituait l'exception : ces auteurs n'ont obtenu, en effet, de flocons mixtes qu'avec quelques systèmes et ils se demandent si, dans ces derniers cas, il n'existerait pas une certaine similitude de structure entre les antigènes mis en jeu.

Tout récemment, dans le laboratoire où nous avons travaillé, M^me^ Capdejelle [16] a pu montrer que les divers systèmes agglutinent chacun, même dans un mélange, pour leur propre compte, sauf s'il existe entre eux la possibilité de réactions croisées.

On se trouve donc amené, à la suite de ces dernières recherches, à admettre l'intervention des forces spécifiques dans la seconde phase de la réaction d'agglutination.

Les forces spécifiques qui, nous le voyons, jouent un rôle essentiel dans la seconde phase de la réaction antigène-anticorps, ne sont probablement pas les seules à intervenir; des forces, a priori non spécifiques, jouent également leur rôle : si, en effet, on fait agir sur l'anticorps divers réactifs qui ne semblent pas empêcher la combinaison de l'antigène avec l'anticorps, comme par exemple le formol [19, 106], le cétène [135], le phényl*iso*cyanate [69], le monobromacétate de sodium [122], la ninhydrine [40, 154], le β-napthoquinone-4-sulfonate de sodium [159], la polyvinyl-pyrrolidone [104] ou les polyoxyéthylène-glycols [105], on modifie cependant l'avidité de l'anticorps et, en conséquence, la seconde phase de la réaction, c'est-à-dire le temps de floculation du système.

I. — ÉTUDE METTANT EN ŒUVRE DES SYSTÈMES NON HOMOLOGUES MAIS A ANTIGÈNE COMMUN

A notre connaissance, aucune expérience n'a été réalisée pour montrer l'intervention éventuelle des forces spécifiques dans la deuxième phase de la réaction de précipitation. C'est à la solution de ce problème que nous nous sommes attaché dans ce chapitre.

Nous avons rappelé précédemment qu'un immunsérum privé de ses lipides perd la propriété de précipiter lorsqu'on le met en présence de son antigène; nous avons expliqué l'absence de précipitation, en particulier par une plus grande hydrophilie relative des complexes. Bien plus, lorsqu'une partie seulement (10 p. 100) de l'immunsérum mis en jeu a subi la délipidation, la précipitation du système se trouve toujours inhibée : l'hydrophilie des complexes reste suffisamment élevée pour que la précipitation soit ralentie. D'ailleurs, en faisant varier la proportion d'immunsérum délipidé, on peut observer tous les intermédiaires entre la précipitation normale et l'absence de précipitation (précipitation plus ou moins retardée).

Dans une première série d'essais, nous avons corroboré certains des résultats établis dans le premier chapitre en montrant que l'addition à un système précipitant (toxine diph-

térique-sérum antidiphtérique de Cheval) de protéines immunes non homologues (globulines antitétaniques de Cheval) ou d'un autre système non homologue (toxine tétanique-sérum antitétanique de Cheval), dont l'immunsérum avait été préalablement privé de ses lipides, n'exerce aucune influence sur la précipitation du premier système.

Nous préparons pour cela quatre séries de trois tubes dans lesquels sont répartis les mélanges suivants :

Tubes n°	1	2	3
Sérum de Cheval antidiphtérique dilué au 1/5 (cm^3)	0,50	0,60	0,70
Eau physiologique (cm^3)	0,20	0,10	0
Echantillon étudié (cm^3)	1	1	1
Toxine diphtérique (cm^3)	1	1	1

Dans la première série, le produit étudié est constitué par de l'eau physiologique (témoin) ; dans la seconde, il est représenté par une solution de globulines de Cheval antitétanique diluée au 1/5; dans la troisième, par une solution identique mais préalablement délipidée; dans la quatrième, enfin, par une solution de globulines de Cheval antitétanique délipidées, diluées et neutralisées par l'antigène correspondant.

Tous les tubes sont placés au bain-marie à 37° C. Nous avons rassemblé dans le tableau XXXIII les temps de floculation observés.

Les chiffres inscrits dans chaque colonne verticale sont pratiquement identiques : les globulines de Cheval antitétanique neutralisées ou non et même délipidées n'interviennent donc absolument pas dans la floculation du sérum de Cheval antidiphtérique. De plus, le résultat concernant notamment la quatrième série montre qu'il ne s'est pas formé d'agrégats mixtes qui auraient certainement inhibé, ou du moins retardé, la précipitation.

La précipitation du système toxine tétanique-antisérum de Cheval étant toujours très lente, on pourrait objecter que, dans ce cas, la précipitation du système toxine diphtérique-antisérum de Cheval s'est produite avant que la toxine tétanique et l'antisérum de Cheval délipidé aient eu le temps de

TABLEAU XXXIII

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE FRACTIONS IMMUNES HÉTÉROLOGUES DÉLIPIDÉES OU NON DÉLIPIDÉES, NEUTRALISÉES OU NON PAR L'ANTIGÈNE CORRESPONDANT (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Tubes n°		1	2	3
Temps de floculation (en mn)	Série n° 1. Eau physiologique	50	**42**	47
	Série n° 2. Globulines de Cheval antitétanique	45	**39**	40
	Série n° 3. Globulines de Cheval antitétanique délipidées	52	**45**	48
	Série n° 4. Globulines de Cheval antitétanique délipidées et neutralisées par l'antigène correspondant	51	**43**	45

réagir. Pour éviter cette critique, nous avons effectué l'expérience inverse, c'est-à-dire que nous avons étudié l'influence exercée sur la floculation du système toxine tétanique-antisérum de Cheval par le système toxine diphtérique-antisérum de Cheval délipidé.

L'expérience est réalisée en tous points comme la précédente; voici les mélanges effectués pour chaque série :

Tubes n°	1	2	3
Globulines de Cheval antitétanique diluées au 1/5 (cm^3)	0,30	0,40	0,50
Eau physiologique (cm^3)	0,20	0,10	0
Echantillon étudié (cm^3)	1	1	1
Toxine tétanique (cm^3)	1,5	1,5	1,5

Nous plaçons au bain-marie l'ensemble de ces mélanges et notons leur durée de floculation (tableau XXXIV).

Cette expérience confirme la première et montre que si l'on met en présence du système toxine tétanique-antisérum de Cheval, soit le système toxine diphtérique-antisérum de Cheval délipidé, soit du sérum de Cheval antidiphtérique normal, soit

TABLEAU XXXIV

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE FRACTIONS IMMUNES HÉTÉROLOGUES DÉLIPIDÉES OU NON DÉLIPIDÉES, NEUTRALISÉES OU NON PAR L'ANTIGÈNE CORRESPONDANT (SYSTÈME TOXINE TÉTANIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Tubes n°		1	2	3
Temps de floculation	Série n° 1... Eau physiologique	3 h. 20	**3 h. 15**	3 h. 30
	Série n° 2... Sérum de Cheval antidiphtérique	3 h. 10	**3 h.**	3 h. 20
	Série n° 3... Sérum de Cheval antidiphtérique délipidé .	3 h. 30	**3 h. 20**	3 h. 30
	Série n° 4... Sérum de Cheval antidiphtérique délipidé et neutralisé par l'antigène correspondant.	3 h. 15	**3 h. 10**	3 h. 20

encore du sérum de Cheval antidiphtérique délipidé, la floculation du système tétanique ne se trouve nullement influencée, chaque système se comportant indépendamment de l'autre.

Pour apporter des arguments supplémentaires à la spécificité de la deuxième phase, nous avons réalisé une deuxième série d'essais consistant à étudier l'influence exercée sur la floculation du système toxine diphtérique-antisérum de Cheval par le système toxine diphtérique-antisérum de Lapin délipidé.

Dans ce cas, les immunsérums proviennent d'espèces différentes, mais le motif spécifique engendré par un même antigène doit être identique et, si notre conception correspond à la réalité, le second système devrait, dans ce cas, exercer une influence sur la floculation du premier.

Nous réalisons donc des expériences calquées sur les précédentes; la relative rareté de l'immunsérum de Lapin nous amène simplement à opérer dans un seul tube, celui correspondant à la zone des proportions optima.

Nous effectuons une série de mélanges constitués par :

Sérum de Cheval antidiphtérique dilué au 1/5.. 0,40 cm³.
Anatoxine diphtérique ..... 1 » cm³.

Nous ajoutons à chacun d'eux 1 cm³ de l'échantillon étudié et nous plaçons nos tubes au bain-marie à 37° C. Voici

les temps de floculation que nous avons observés (tableau XXXV) :

TABLEAU XXXV

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE FRACTIONS IMMUNES HOMOLOGUES, MAIS D'ORIGINE ZOOLOGIQUE DIFFÉRENTE, DÉLIPIDÉES OU NON DÉLIPIDÉES, NEUTRALISÉES OU NON PAR L'ANTIGÈNE CORRESPONDANT (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Echantillon étudié	Temps de floculation
Eau physiologique	2 h. 20
Globulines antidiphtériques de Lapin diluées au 1/8	2 h. 10
Globulines antidiphtériques de Lapin diluées au 1/8 et neutralisées par l'antigène	2 h. 05
Globulines antidiphtériques de Lapin délipidées et diluées au 1/8	3 h. 15
Globulines antidiphtériques de Lapin délipidées, neutralisées par l'antigène et diluées au 1/8	3 h. 00

Cette expérience montre les faits suivants :

1° Lorsque le système Lapin est ajouté au système Cheval, la floculation de ce dernier n'est pas inhibée et apparaît même plus rapidement (deux heures cinq minutes au lieu de deux heures vingt minutes) ; ceci est vraisemblablement dû simplement à une plus grande concentration en protéines.

2° L'addition du système Lapin (dont l'anticorps a été délipidé) au système Cheval provoque un très net retard de la floculation de ce dernier (trois heures au lieu de deux heures vingt minutes) ; l'hypothèse que nous avons formulée trouve dans ce résultat sa confirmation. Le système antidiphtérique de Lapin forme un agrégat mixte avec le système antidiphtérique de Cheval en raison de la similitude de leur motif spécifique : les forces spécifiques interviennent donc dans la seconde phase.

3° On pourrait s'étonner en constatant que l'addition de globulines antidiphtériques de Lapin au système diphtérique de Cheval n'influence pas le temps de floculation. Le très faible titre en anticorps du sérum de Lapin antidiphtérique (en comparaison avec celui de Cheval) justifie la similitude des temps de floculation. Cette particularité permet d'apprécier d'autant mieux l'influence inhibitrice entraînée par l'addition de globulines antidiphtériques de Lapin dilipidées.

Dans une autre série d'essais, nous avons interverti les systèmes : cette fois, nous avons étudié l'effet inhibiteur exercé par le système Cheval (délipidé ou non, neutralisé ou non) sur la floculation du système Lapin. Notre expérience a été absolument conduite comme la précédente. Voici nos mélanges :

Globulines de Lapin antidiphtérique diluées au 1/8. 1 » cm³
Echantillon étudié ..... 0,1 cm³
Anatoxine diphtérique ..... 0,1 cm³

et nos résultats (tableau XXXVI) :

TABLEAU XXXVI

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION DE FRACTIONS IMMUNES HOMOLOGUES, MAIS D'ORIGINE ZOOLOGIQUE DIFFÉRENTE, DÉLIPIDÉES OU NON DÉLIPIDÉES, NEUTRALISÉES OU NON PAR L'ANTIGÈNE CORRESPONDANT (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE LAPIN).

Echantillon étudié	Temps de floculation
Eau physiologique	2 heures
Sérum antidiphtérique de Cheval dilué au 1/5.....	3 heures
Sérum antidiphtérique de Cheval dilué au 1/5 et neutralisé par l'antigène	1 h. 50
Sérum antidiphtérique de Cheval délipidé et dilué au 1/5..	Plus de 5 h.
Sérum antidiphtérique de Cheval délipidé, neutralisé par l'antigène et dilué au 1/5	Plus de 5 h.

Ces résultats confirment en tous points les précédents; on notera simplement en passant que le sérum antidiphtérique de Cheval a retardé nettement la floculation du système toxine diphtérique-antisérum de Lapin (trois heures au lieu de deux heures) en raison de sa richesse en anticorps. On observe une inhibition considérable de la précipitation spécifique du système Lapin par le sérum de Cheval délipidé, neutralisé ou non : ici encore la similitude du motif spécifique a provoqué la formation d'agrégats mixtes, bien que l'origine zoologique des anticorps soit différente.

Ces diverses séries d'expériences mettent bien en évidence le rôle que jouent les forces spécifiques dans la seconde phase de la réaction de précipitation antigène-anticorps.

Désirant étayer encore les résultats précédemment exposés, nous avons réalisé une dernière série de recherches, dans laquelle nous avons mis en œuvre un isotope radioactif, l'iode 131 (^{131}I).

II. — ÉTUDE METTANT EN ŒUVRE L'IODE RADIOACTIF

Afin de corroborer les résultats précédemment exposés, nous avons cherché à « marquer » certains anticorps à l'aide d'iode radioactif, afin de montrer que des systèmes immunologiques différents, mis en présence, ne floculent pas en même temps. Pour cela, nous avons préparé des radio-iodoprotéines, nous inspirant de la technique préconisée par Pressman [130].

Notre mode opératoire a consisté à mettre en contact pendant cinq minutes les réactifs suivants :

1 cm³ d'iodure de potassium M/100,
1 millicurie d'^{131}I sous forme d'iodure,
15 mg de nitrite de sodium,
2,5 cm³ d'acide chlorhydrique 2 N.

Les cinq minutes écoulées, le *p*H du milieu est amené à 8 à l'aide de soude, et la solution ainsi traitée est mise en contact pendant une demi-heure avec 10 cm³ d'une solution de globulines provenant de 10 cm³ de sérum et mises en solution dans un tampon boraté à *p*H 8. L'ensemble est alors porté à la dialyse pendant douze heures contre de l'eau ordinaire courante, puis pendant vingt-quatre heures contre de l'eau physiologique. La solution obtenue est enfin diluée pour l'usage au 1/5 par rapport au volume de sérum immun dont on est parti.

Avec cette technique, nous avons pu préparer :

a) Des globulines antidiphtériques radio-iodées;

b) Des globulines antitétaniques radio-iodées.

Nous avons réalisé une série de sept mélanges différents. Nous ne nous attendions pas, certes, à obtenir des résultats absolus, et ceci pour trois raisons essentielles :

1° La fixation de l'iode sur les molécules protéidiques présente une relative instabilité;

2° Les anticorps ne constituent qu'une faible partie de la fraction globulines, qui a été uniformément iodée;

3° Le traitement que nous allons faire subir à nos mélanges (centrifugation) n'est pas sans perturber quelque peu le phénomène de floculation et va provoquer la précipitation

physicochimique de fractions non immunes, mais néanmoins radio-iodées. Lorsque l'on connaît toutes les interactions physicochimiques qui ont lieu dans un milieu contenant diverses protéines, on ne saurait s'attendre à des résultats absolus, mais seulement à des données relatives. C'est la raison pour laquelle nous ne tiendrons pas compte des chiffres eux-mêmes, mais plutôt des pourcentages qui en découlent.

Dans nos expériences, nous avons mis en œuvre les systèmes suivants :

1° Toxine diphtérique-antisérum de Cheval; ce système, à la dilution où nous avons opéré, flocule en quatre heures;

2° Toxine tétanique-antisérum de Cheval dont la floculation se produit en deux heures dans nos conditions opératoires.

Dans un essai préliminaire, nous avons noté que l'antitoxine tétanique avait fixé près de cinq fois plus de radio-iode que l'antitoxine diphtérique pour un égal volume de solution protéidique.

Notre premier mélange a consisté à mettre en contact des globulines antitétaniques iodées (3 cm^3), des globulines antidiphtériques iodées (4 cm^3), de la toxine diphtérique (2,2 cm^3) et de la toxine tétanique (20 cm^3). Les immunsérums se trouvent ainsi dans la zone des proportions optima.

Pour tenter de recueillir les précipités intéressant chaque système, et compte tenu de leur vitesse de floculation, nous avons soumis le mélange à la centrifugation après trois heures de repos à 37° C, afin de recueillir le premier précipité seul (A); le liquide surnageant laissé à 37° C était de nouveau centrifugé six heures plus tard (B).

Nous avons déterminé la radioactivité des deux précipités après deux lavages à l'eau physiologique et dessiccation à l'étuve à 37° C pendant vingt-quatre heures. Pour le précipité A, nous avons trouvé 52.580 coups (*); pour le précipité B, 11.690 coups.

Ceci se montre conforme à l'essai témoin que nous avions effectué et confirme la plus grande fixation d'iode par les globulines antitétaniques.

Dans un second ballon, nous avons réalisé un mélange très comparable, mais nous avons remplacé la toxine tétanique par de l'eau physiologique; dans ces conditions, nous devons

(*) Déterminés en soixante secondes, à l'aide d'un compteur d'impulsions Saphymo.

avoir un seul précipité, celui du système diphtérique, c'est-à-dire se formant après quatre heures.

Nos résultats ont été les suivants :

— Radioactivité du premier précipité (ce que la première centrifugation a fait apparaître) : 9.920 coups, ne représentant que 18 p. 100 du chiffre que l'on aurait dû obtenir si la toxine tétanique avait été mise en jeu;

— Radioactivité du second précipité : 12.080 coups (représentant 100 p. 100 de la radioactivité du système diphtérique).

Dans un troisième mélange, très voisin du précédent, c'est la toxine diphtérique qui est remplacée par de l'eau physiologique.

Dans ces conditions, le premier précipité (obtenu après trois heures) doit être riche en iode radioactif. En principe, il ne doit pas y avoir de précipité spécifique après quatre heures.

Voici nos résultats :

— Premier précipité : 45.350 coups, soit près de 87 p. 100 de la radioactivité du premier système;

— Deuxième précipité : 2.600 coups, soit seulement 22 p. 100 de la radioactivité de l'anticorps diphtérique.

Un quatrième mélange est constitué par le système diphtérique iodé et par le système tétanique non iodé (0,6 cm^3 de globulines de Cheval antitétanique et 2,4 cm^3 d'eau physiologique). Ainsi, on doit recueillir après trois heures un précipité non radioactif et après neuf heures un précipité présentant au contraire des qualités radioactives.

Il en est bien ainsi, puisque le premier précipité donne 9.760 coups, chiffre relativement minime car il ne représente que 18 p. 100 de la radioactivité du système tétanique, tandis que le second donne 10.900 coups, ce qui représente 93 p. 100 de la radioactivité du système diphtérique.

Un cinquième mélange est constitué par des globulines antidiphtériques iodées sans toxine correspondante (remplacée par de l'eau physiologique) et par le même système tétanique non iodé que précédemment. Dans ces conditions, il ne doit se former qu'un seul précipité avant trois heures et ne présentant pas de radioactivité. En effet, le premier précipité, bien que volumineux, correspond seulement à la valeur de 2.100 coups, chiffre très faible; le second (infime) à 360 coups, chiffre négligeable.

Un sixième mélange est inverse du quatrième : il renferme le système diphtérique non iodé (0,8 cm^3 de globulines de

Cheval antidiphtérique et 3,2 cm³ d'eau physiologique) et le système tétanique iodé. Le premier précipité formé doit être radioactif, contrairement au second. Le premier précipité correspond à la valeur de 46.270 coups, ce qui représente 88 p. 100 de la radioactivité du système, tandis que le second précipité donne une valeur de 2.350 coups, chiffre relativement minime, car il ne correspond qu'à 20 p. 100 de la radioactivité du système diphtérique.

Dans un septième mélange, enfin, nous avons mis en présence le système antidiphtérique non iodé comme précédemment et des globulines antitétaniques iodées, sans la toxine correspondante remplacée par de l'eau physiologique.

Nous devons donc obtenir un seul précipité spécifique, formé après quatre heures et non radioactif. Nous avons trouvé les valeurs de 1.670 coups pour le premier précipité (infime), chiffre minime, et 860 coups pour le second, chiffre négligeable, bien que le précipité obtenu fût du volume normalement attendu.

Ces diverses expériences, dont il convient simplement de tirer, comme nous l'avons dit, une orientation et non des valeurs absolues, plaident en faveur de la spécificité du deuxième temps dans la réaction de précipitation antigène-anticorps.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Nous avons montré, dans ce chapitre, que si l'on met en présence deux systèmes floculants, chacun d'eux se conduit indépendamment de l'autre, et qu'il ne se forme pas de floculat mixte, sauf dans le cas où les deux anticorps possèdent le même motif spécifique : des forces spécifiques interviennent donc au cours de la seconde phase de la précipitation antigène-anticorps. Nous apportons ainsi des résultats expérimentaux dans un domaine jusqu'alors resté presque exclusivement hypothétique.

Ces résultats, qui infirment les conceptions classiques de Bordet, sont en parfait accord avec les théories de Marrack et Heidelberger. Ils confirment certains de ceux rapportés au cours du chapitre premier (voir pp. 64-70) et permettent d'expliquer en particulier la raison pour laquelle un sérum ou des fractions protéidiques, délipidés ou non, non immuns ou non homologues, n'exercent aucune influence inhibitrice sur la réaction de précipitation antigène-anticorps.

CHAPITRE IV

CONFIRMATION DU RÔLE JOUÉ PAR LES LIPIDES DANS LE PHÉNOMÈNE DE FLOCULATION : ÉTUDE DE L'ACTION DE QUELQUES COMPOSÉS SUR LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

A la suite des recherches précédemment décrites, nous avons émis une hypothèse sur le rôle exercé par les lipides de l'immunsérum dans la réaction de précipitation spécifique.

Nous avons pensé que la délipidation intervenait :

1° En facilitant la solubilisation du complexe spécifique par départ de l'important pôle hydrophobe des lipides;

2° En renforçant cette solubilisation par la libération de certains groupes hydrophiles de la molécule de protéine anticorps;

3° En modifiant quelque peu la réactivité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène par l'apparition de ces derniers groupes hydrophiles.

Ces trois points ont trouvé leur justification au cours de notre étude mettant en œuvre la diffusion latérale de la lumière (voir chapitre II de la deuxième partie).

La micelle lipidique étant unie à la molécule protéidique par un groupement amine de cette dernière (voir chapitre II de la première partie), on se trouve conduit à penser, contrairement à certaines hypothèses [135], que ces groupes $-NH_2$ ne jouent pas un rôle négligeable dans les propriétés spécifiques de l'anticorps.

Ce rôle particulier des groupements aminés a pu être mis en évidence dans diverses recherches au cours desquelles ont

été étudiés parallèlement le pouvoir floculant d'un anticorps et le « blocage » de ces groupes — NH_2 par divers réactifs.

Chow et Goebel [19], puis Neuzil et Pautrizel [106] ont étudié l'action du formol, réactif des amines, et ont montré qu'un anticorps traité par ce réactif perd partiellement ou complètement, suivant la dose mise en œuvre, ses propriétés floculantes.

Le cétène, qui lui aussi réagit sur les groupes aminés, se conduit de la même façon (Sandor et Goldie [135]). Il en est encore de même pour le phényl*iso*cyanate (Kleczkowski [69]), le monobromacétate de sodium (Pautrizel et Tayeau [122]), l'alloxane (Tayeau et Neuzil [159]), etc. Tous ces réactifs qui réagissent avec les groupements amine des protéines ralentissent ou même inhibent les propriétés floculantes de l'anticorps sur lequel on les fait agir, et cela quel que soit le système ou l'origine zoologique de l'anticorps.

Parmi les réactifs étudiés, la ninhydrine (Tayeau, Faure, Neuzil et Pautrizel [155]) et le β-naphtoquinone-4-sulfonate de sodium (Tayeau et Neuzil [159]) occupent une place privilégiée : ces deux réactifs retardent également la floculation des immunsérums de Cheval, mais, contrairement aux autres, ils accélèrent la floculation des immunsérums de Lapin. Aucun argument réellement satisfaisant n'a pu être fourni pour expliquer ce phénomène, compliqué encore par le fait que l'alloxane qui, comme la ninhydrine ou le β-naphtoquinone-4-sulfonate de sodium, donne la réaction de Strecker, ne se conduit cependant pas du tout de la même façon. Les auteurs pensent que ces deux réactifs, en plus de leur action purement chimique, modifieraient la structure secondaire des protéines anticorps chez le Lapin seulement, en faisant apparaître des groupements « polaires », renforçant la spécificité. Le cas des polymères hydrosolubles est également curieux : ces substances (polyoxyéthylène-glycols [105], polyvinyl-pyrrolidone [104]) accélèrent la réaction de précipitation spécifique et cela quel que soit le système utilisé.

Pour expliquer l'action des réactifs retardants, diverses raisons ont été invoquées : on a fait appel en particulier aux modifications de solubilité des protéines anticorps; on conçoit, en effet, que si l'anticorps acquiert une solubilité plus grande, le complexe a tendance à précipiter plus tardivement [voir 135]. Pons [voir 150], dès le début de ses essais, a incriminé des modifications d'avidité. C'est à cette conclusion que sont également parvenus Tayeau et M^lle^ Faure [154] en ce qui

concerne l'action de la ninhydrine : ces auteurs ont prouvé que le complexe antigène-anticorps de Cheval « ninhydrinisé » se forme moins rapidement que le complexe témoin obtenu à partir d'anticorps non traités par la ninhydrine; l'inverse se produit avec les systèmes comprenant des anticorps de Lapin.

Doit-on admettre alors que les fonctions amine constituent le motif spécifique de l'anticorps ? Une telle conclusion nous paraît exagérée; d'ailleurs Sandor et Goldie [135] estiment que ces groupements n'exercent, par eux-mêmes, aucune influence sur la réaction antigène-anticorps.

Nous pensons, pour notre part, que les réactifs utilisés réagissent, en plus des fonctions amine, sur bien d'autres fonctions chimiques. A ce sujet, nous avons prouvé que la ninhydrine n'agit pas seulement sur les groupements aminés des protéines, mais encore sur les fonctions sulfhydrile [157]. Tayeau et M^lle^ Pissot sont parvenus à une conclusion identique en ce qui concerne l'action du monobromacétate de sodium.

L'action des divers réactifs est donc beaucoup plus complexe qu'on ne le pense généralement; d'ailleurs, en dehors des actions purement chimiques, il faut encore noter des altérations plus ou moins intenses de la structure secondaire des protéines anticorps; Loiseleur l'a prouvé en ce qui concerne le formol.

I. — ÉTUDE, EN LUMIÈRE DIFFUSÉE, DU MODE D'ACTION DE CERTAINS COMPOSÉS ACTIFS SUR LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Nous avons voulu savoir si tous ces réactifs dits « adjuvants de la réaction antigène-anticorps », manifestaient une action comparable. Pour cela, nous avons suivi comparativement, grâce à la diffusion latérale de la lumière, la formation de complexes antigène-anticorps et la formation des mêmes complexes, dans lesquels l'anticorps avait été préalablement traité par l'un de ces réactifs.

Voici quelques-unes de nos expériences :

1° *Cas du formol.* — Ce réactif, on le sait [19], après avoir agi sur l'anticorps, retarde la précipitation spécifique.

Nous avons étudié le système toxine diphtérique-antisérum de Cheval et nous avons suivi le mode opératoire précédemment décrit (voir p. 84).

Voici les résultats obtenus au cours de l'une de nos expériences, dans laquelle le formol a réagi sur le sérum pendant deux heures à la température de 15° C et à la concentration de 1 p. 100 (tableau XXXVII) :

TABLEAU XXXVII

INFLUENCE EXERCÉE PAR L'ADDITION DE FORMOL A L'IMMUNSÉRUM SUR L'INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE LATÉRALEMENT AU COURS DE LA RÉACTION ANTIGÈNE - ANTICORPS (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Temps (en minutes).....		1/2	1	2	5	10	30	45	60	90	120
Intensité de la lumière diffusée latéralement	Système non formolé (témoin) ...	31	36	42	51	55	57	60	60		
	Système formolé...	27	33	36	45	52	57	60	62	64	67

Il ressort de cet essai que les agrégats se forment plus lentement lorsque le sérum a été préalablement traité par le formol; ce réactif diminue donc l'avidité de l'anticorps pour l'antigène. Notons encore que, pour floculer, l'agrégat doit atteindre une taille plus grande; cela montre que, si les forces spécifiques jouent le rôle essentiel dans la floculation, l'effet des forces non spécifiques ne doit cependant pas être négligé.

2° *Cas du monobromacétate de sodium.* — Ce réactif, comme le formol, retarde la floculation [122].

L'expérience a été réalisée comme la précédente et le monobromacétate de sodium a réagi sur le sérum pendant deux

TABLEAU XXXVIII

INFLUENCE EXERCÉE PAR L'ADDITION DE MONOBROMACÉTATE DE SODIUM A L'IMMUNSÉRUM SUR L'INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE LATÉRALEMENT AU COURS DE LA RÉACTION ANTIGÈNE - ANTICORPS (SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL).

Temps (en minutes).....		1/2	1	2	5	15	30	45	60	90	120
Intensité de la lumière diffusée latéralement	Système témoin....	27	37	45	52	54	55	56	58	59	
	Système traité par le monobromacétate	21	29	35	46	62	72	76	78	80	80

heures, à la température de 15° C et à la concentration de 0,4 N.

Le tableau XXXVIII indique les valeurs que nous avons enregistrées.

Ces résultats sont absolument parallèles à ceux obtenus avec l'aldéhyde formique.

3° *Cas des polymères hydrosolubles.* — Nous avons mis en œuvre des polyoxyéthylène-glycols de poids moléculaire élevé, communément désignés sous le nom de *Carbowax*. Parmi les Carbowax, nous avons choisi le Carbowax 6.000 qui, nous l'avons démontré [105], possède la propriété d'accélérer la précipitation spécifique.

Nous avons opéré suivant la même technique que précédemment; le Carbowax se trouve dans le mélange final à la concentration de 2,5 p. 100; les chiffres obtenus sont rassemblés dans le tableau XXXIX.

TABLEAU XXXIX

Influence exercée par l'addition de carbowax 6.000 a l'immunsérum sur l'intensité de la lumière diffusée latéralement au cours de la réaction antigène - anticorps (système toxine diphtérique - antisérum de Cheval).

Temps (en minutes).....		1	2	3	4	5	10	15	20	25
Intensité de la lumière diffusée latéralement	Système témoin....	18	23	29	30	39	36	39	39	39
	Système traité par le Carbowax.....	29	38	41	43	44	46	47	48	

Il résulte de cet essai que le Carbowax, comme d'ailleurs la ninhydrine [voir 40], possède la propriété d'augmenter l'avidité de l'anticorps pour l'antigène.

Notons encore un fait intéressant : la floculation, dans cette expérience, se produit après vingt-cinq minutes pour le témoin et après onze minutes pour le système traité par le Carbowax. A ce moment, la lumière diffusée atteint, pour le témoin, la valeur de 39 et, pour le système traité, celle de 46. Cette constatation laisserait supposer que, pour floculer, les agrégats du système traité doivent atteindre une taille supérieure à celle des agrégats du système témoin; elle se montrerait alors en contradiction avec les conceptions de Neuzil, qui attribue l'effet des Carbowax à une action physicochimique sur les

γ-globulines anticorps (IIe Congrès international de Biochimie, Paris, 1952, p. 400). Cette action des Carbowax vient d'ailleurs de faire l'objet d'une étude détaillée (voir Jensen R., thèse Sc., Bordeaux, sous presse).

Nous avons également réalisé des essais avec la polyvinylpyrrolidone qui, comme les polyoxyéthylène-glycols, active la floculation des immunsérums traités (Neuzil et Marquevielle [104]). Ces essais se sont révélés parallèles à ceux obtenus avec le Carbowax.

Toutes ces expériences montrent que les dérivés modifiant la réaction antigène-anticorps n'interviennent pas en agissant simplement sur les propriétés physiques de ce dernier constituant, mais en modifiant surtout son avidité.

Dans le but de préciser quels peuvent être les groupements jouant le rôle principal dans cette avidité, nous avons réalisé une dernière étude au cours de laquelle nous avons mis en œuvre de nombreux réactifs. Nous avons étudié particulièrement des réactifs oxydants, puisque la plupart des substances actives (ninhydrine, β-naphtoquinone-4-sulfonate de sodium, alloxane, iode, etc.) présentent des propriétés oxydantes; nous avons porté également notre attention sur diverses substances réductrices.

II. — ÉTUDE DE L'ACTION DE DIVERSES SUBSTANCES OXYDANTES OU RÉDUCTRICES SUR LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE

Nous avons étudié l'influence d'un certain nombre de composés oxydants ou réducteurs sur le phénomène de précipitation spécifique; nous avons utilisé, au cours de ces recherches, les deux systèmes immunologiques suivants :

1° Système toxine diphtérique-antisérum de Cheval;

2° Système pseudoglobulines de Mouton-antisérum de Lapin.

Tous nos essais ont été réalisés en suivant le mode opératoire ci-après (*) :

Le composé à étudier est dissous dans l'eau et le p*H* de

(*) Seul fait exception l'oxozone que sa forme gazeuse empêche d'utiliser en solution titrée. Pour ce composé, nous nous sommes contenté de faire barboter le gaz dans l'immunsérum pendant un temps déterminé, puis de laisser la solution d'anticorps à la température ordinaire jusqu'au lendemain.

cette solution aqueuse est mesuré; la solution est neutralisée, si besoin est, par addition de soude ou d'acide chlorhydrique suivant le cas, puis elle est amenée au titre désiré. On ajoute au sérum immun un volume égal du réactif ainsi préparé; on laisse en contact pendant toute une nuit, et le lendemain on dilue la solution anticorps de façon à mesurer la vitesse de floculation après addition de l'antigène correspondant. Dans tous les cas, une expérience comparative est effectuée en remplaçant la solution de réactif par de l'eau physiologique.

Nous avons résumé dans le tableau XL les résultats auxquels nous sommes parvenu.

En ce qui concerne la streptomycine, nous avons repris cette étude en opérant à un *p*H plus élevé. En effet, Tayeau et coll. [153] ont montré que ce composé ne pouvait se fixer sur les protéines sériques qu'en milieu alcalin. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons donc étudié l'influence de la streptomycine en opérant à *p*H 9,5 (*). A la concentration de 5 p. 100, nous n'avons observé aucune action nette sur les deux systèmes immunologiques; à la concentration de 10 p. 100, on note une action retardatrice avec le système Cheval et légèrement accélératrice avec le système Lapin. A ce *p*H, la streptomycine est fixée sur les groupements thiol (**) et les groupements carboxyliques qui sont fortement ionisés. L'action de la streptomycine est ainsi à rapprocher, bien que nettement moindre, de celle de la ninhydrine [40].

Certains, parmi les réactifs étudiés, font preuve d'une très grande activité et, même agissant à très faible dose sur l'anticorps, retardent ses propriétés floculantes (cas de la chloramine T, de l'oxozone, de l'eau oxygénée, du persulfate de sodium). A ces réactifs que nous avons étudiés, il convient d'ajouter le formol, le monobromacétate de sodium, l'alloxane, etc.

Est-il possible de trouver un lien commun entre les réactifs exerçant une nette influence ? Nous avons réalisé diverses recherches sur ce point. Nous avons étudié, en particulier, les diagrammes électrophorétiques (protéines et lipides) des immunsérums normaux et des mêmes immunsérums traités par les différents réactifs. Les résultats obtenus n'ont montré

(*) Des essais préliminaires nous ont, en effet, montré que les vitesses de floculation demeurent pratiquement inchangées jusqu'à *p*H 9,5 pour le système toxine diphtérique-antisérum de Cheval, et jusqu'à *p*H 10 pour le système pseudoglobulines de Mouton-antisérum de Lapin.

(**) Cohen (S. S.). — *J. biol. Chem.*, 1947, **168**, 511.

TABLEAU XL

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION PAR L'ADDITION A L'IMMUNSÉRUM DE DIVERS COMPOSÉS RÉDUCTEURS OU OXYDANTS (SYSTÈMES TOXINE DIPHTÉRIQUE - ANTISÉRUM DE CHEVAL ET PSEUDO-GLOBULINES DE MOUTON - ANTISÉRUM DE LAPIN).

Composé étudié	Temps de floculation (en mn)			
	Système Cheval		Système Lapin	
	Sérum témoin	Sérum traité	Sérum témoin	Sérum traité
1° *Réducteurs*				
Acide thiomalique à 7,5 p. 100....	22	20	11	16
Cystéine à 10 p. 100.....	16	21	13	28
Cyanure de potassium à 5 p. 100..	14	20	12	14
Ferrocyanure de potassium à 5 p. 100	22	28	10	11
Sulfite de sodium à 5 p. 100.....	20	25	11	14
Hyposulfite de sodium à 5 p. 100..	24	23	17	17
Hydrosulfite de sodium à 5 p. 100.	24	29	16	20
2° *Oxydants*				
Sulfate de streptomycine à 5 p. 100.	19	19	21	23
Ferricyanure de potassium à 5 p. 100	25	32	11	13
Chloramine T à 0,5 p. 100.....	20	52	13	38
Perhydrol à 20 volumes	21	50	12	59
Persulfate de potassium à 0,5 p. 100	26	115	16	57
Chlorate de sodium à 5 p. 100....	28	26	17	18
Perchlorate de sodium à 5 p. 100..	19	24	16	18
Perborate de sodium en solution saturée (2 p. 100 environ).....	19	25	19	20
Oxozone (barbotage du gaz dans la solution anticorps pendant 2 minutes) (*).....	—	—	12	32
Oxozone (barbotage du gaz dans la solution anticorps pendant 3 minutes)	26	72	—	—

(*) Il s'agit en réalité d'un mélange d'oxygène (O_2), d'ozone (O_3) et d'oxozone (O_4).

aucun parallélisme entre l'aspect des protéinogrammes et des lipidogrammes et l'action exercée sur les anticorps.

Beaucoup, parmi les composés les plus actifs, sont des substances qui réagissent sur les groupes sulfhydrilés : c'est le cas pour le formol (Ratner et Clarke) et pour tous les réactifs oxydants en général. Or ces groupements, on le sait [157], peuvent jouer un rôle essentiel dans les propriétés de certains enzymes. Griffith [voir 157] a montré que l'hexokinase perdait son activité enzymatique par disparition de ses groupements thiol; mais cette activité peut lui être restituée par addition au milieu de cystéine par exemple : on s'explique que ce réactif puisse ramener la protéine dans son état primitif par transformation des groupes — S — S — en 2 — SH.

Nous avons essayé d'appliquer ce procédé aux immunsérums traités par divers adjuvants et par la ninhydrine en particulier. Nous n'avons restitué aucune propriété floculante et nous croyons pouvoir en donner la raison : lorsque le réactif a simplement transformé les groupes thiol en disulfure, on peut espérer obtenir la réversibilité de la réaction par l'action de substances comme la cystéine ou le glutathion réduit; mais, comme nous l'avons montré [157], l'effet exercé par la ninhydrine sur les groupements thiol est beaucoup plus intense; ce réactif réagit en effet sur la cystéine en formant très certainement, à côté d'un petit nombre de groupements disulfure, des groupes acide sulfonique et peut-être même des dérivés thiazolidiniques, dont la réversibilité ne saurait être envisagée par simple addition de cystéine.

Les essais que nous avons réalisés n'infirment donc pas un rôle éventuel des groupements — SH, sur lesquels réagissent la plupart des substances actives sur la réaction antigène-anticorps.

De toute cette étude, il résulte que les composés actifs sur la réaction de précipitation spécifique provoquent, pour certains tout au moins, les mêmes modifications à la molécule d'anticorps que la délipidation; cette dernière opération voit son action renforcée par une augmentation de l'hydrophilie de la molécule anticorps.

Tous ces faits nous incitent à penser qu'il existe un parallélisme étroit entre les réactions immunitaires et les réactions enzymatiques : les unes comme les autres manifestent une spécificité très étroite; les unes comme les autres sont sensibles à la moindre altération: les groupements chimiques dont

se trouvent hérissées les molécules de l'enzyme, comme celles de l'anticorps, ont besoin de leur intégrité pour que l'activité biologique puisse être entièrement conservée.

Les travaux toujours plus précis sur le mécanisme de la réaction antigène-anticorps, l'étude de sa cinétique, feront peut-être rapprocher en des chapitres très voisins l'immunologie et l'enzymologie.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Après avoir rattaché la spécificité de l'anticorps aux groupements chimiques portés par la molécule, nous rappelons l'action exercée par certaines substances sur la réaction de précipitation spécifique et expliquons ainsi une partie du rôle joué par la délipidation.

Grâce à des expériences utilisant la diffusion latérale de la lumière, nous avons pu rattacher à une modification de l'avidité de l'anticorps l'influence de quelques composés sur la réaction antigène-anticorps.

L'étude de l'action exercée sur la floculation par divers corps oxydants ou réducteurs nous permet d'émettre quelques considérations sur le parallélisme qui existe entre les réactions immunitaires, d'une part, et les réactions enzymatiques, d'autre part.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nos recherches ont pour but d'expliquer la raison pour laquelle un immunsérum précipitant perd, par enlèvement de ses lipides, sa propriété de floculer en présence de son antigène, tout en conservant cependant ses propriétés immunologiques.

Afin de pouvoir discuter nos résultats, nous avons exposé, dans la première partie de notre travail (étude historique), nos connaissances du mécanisme de la réaction de précipitation antigène-anticorps (chapitre premier), et de l'état sous lequel se trouvent les lipides dans le sérum sanguin (chapitre II).

Nous abordons nos recherches expérimentales par une étude sur les techniques de délipidation du sérum : cette étude nous conduit à porter notre choix sur la méthode de Hardy et Gardiner qui, tout en respectant l'édifice protéidique, assure une délipidation très efficace.

Grâce à cette technique, nous étudions les propriétés floculantes d'immunsérums de Lapin et de Cheval, dont une portion plus ou moins importante a subi la délipidation; cette étude nous conduit à admettre que la délipidation provoque en réalité un retard de la floculation; souvent ce retard est fort important, et c'est la raison pour laquelle il a été confondu avec une inhibition. Nos résultats nous amènent alors à formuler trois hypothèses sur l'effet de la délipidation :

1° La délipidation provoque le départ d'importants groupes hydrophobes, augmentant ainsi l'hydrophilie du complexe antigène-anticorps et par conséquent sa solubilité dans l'eau;

2° La délipidation libère des groupes positifs hydrophiles de la molécule d'anticorps, ce qui renforce encore son affinité pour l'eau;

3° L'apparition de ces groupes perturbe le motif spécifique de l'anticorps, si bien que la combinaison antigène-anticorps

délipidé s'effectue beaucoup plus lentement et présente une stabilité nettement moins grande que la combinaison témoin à base d'anticorps non délipidé.

Cette stabilité réduite du complexe antigène-anticorps délipidé explique sa facile décomposition, contrairement à ce qui se passe avec le complexe témoin; divers types d'expériences plaident en faveur de cette assertion.

Nous démontrons ensuite que le complexe antigène-anticorps normal atteint sa taille définitive en une période égale à la moitié environ du temps de floculation : à partir de ce moment, il devient très difficile de perturber la floculation.

Dans tous les phénomènes que nous avons étudiés, les forces spécifiques jouent un rôle primordial : l'addition de sérum délipidé ou d'un système immunologique délipidé n'exerce d'influence sur la précipitation d'un système floculant que s'ils présentent les mêmes motifs spécifiques. Les sérums non immuns ou non homologues ne montrent aucune action vis-à-vis des systèmes floculants.

Nous terminons le premier chapitre de notre étude expérimentale par une discussion sur certaines expériences permettant de restituer à un immunsérum délipidé ses propriétés floculantes. Nous apportons dans cette discussion quelques résultats expérimentaux.

Le second chapitre de notre étude tend vers un double but :

1° Mettre en évidence, autrement que par des techniques utilisant l'animal, la présence d'anticorps dans un immunsérum délipidé;

2° Apporter des arguments aux hypothèses émises dans le premier chapitre.

Nous sommes parvenu à mettre en évidence les anticorps délipidés par l'analyse capillaire sur papier, l'électrophorèse sur papier et la diffusion latérale de la lumière. Cette dernière technique nous a permis de suivre, en fonction du temps, la réaction antigène-anticorps et de comparer l'évolution d'un système normal et du même système préalablement délipidé. Cette étude a montré que l'obtention d'agrégats antigène-anticorps d'une taille donnée est beaucoup plus lente avec le système délipidé qu'avec le système témoin; elle prouve encore que la floculation d'un système délipidé exige la formation d'agrégats notablement plus volumineux que dans le cas du même système immunologique non délipidé. Cette double constatation montre qu'à taille égale le complexe délipidé est

beaucoup plus hydrophile que le complexe témoin non délipidé; nos résultats prouvent encore la lenteur de la réaction entre l'antigène et l'anticorps délipidé, témoin d'une réduction de l'avidité et, sans doute, d'un rétrécissement de la spécificité.

Le troisième chapitre comporte une application des résultats précédents. Bordet considère deux phases au cours de la réaction de précipitation spécifique :

1° Combinaison entre les deux constituants, due aux seules forces spécifiques;

2° Précipitation de la combinaison formée au cours de la phase précédente correspondant à un phénomène physico-chimique dans lequel des forces non spécifiques interviennent seules.

Grâce à une étude mettant en œuvre des systèmes immunologiques différents délipidés ou non, ainsi que des systèmes immunologiques identiques, mais provenant d'espèces différentes, nous sommes parvenu à montrer que la deuxième phase de la réaction de précipitation fait intervenir également des forces spécifiques. Ce résultat, corroboré par une étude mettant en œuvre l'iode radioactif, infirme la conception classique de Bordet. Nous avons conclu que toute théorie faisant intervenir soit les seules forces non spécifiques (Bordet), soit les seules forces spécifiques (Marrack, Heidelberger) ne correspond pas à la réalité : les deux types de forces interviennent.

Dans un dernier chapitre, nous avons discuté des modifications produites par l'enlèvement des lipides sur l'avidité et la spécificité de l'anticorps. Nous avons ainsi été amené à étudier l'action de divers adjuvants.

Nous avons été conduit à penser que la délipidation intervient non seulement en augmentant la solubilité du complexe spécifique, mais encore en modifiant l'avidité de l'anticorps.

Nous avons enfin terminé notre étude en examinant l'action exercée par divers réactifs oxydants ou réducteurs sur la floculation, ce qui nous a permis une comparaison entre l'immunologie et l'enzymologie, chapitres qui, à la lumière de nos résultats, semblent présenter bien des points communs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abramson (H. A.). — *Nature*, 1935, **135**, 995.
2. Adnot (A.). — Contribution à l'étude des protides du sérum. Dosage de la globuline et de la sérine par une nouvelle méthode. Thèse Doct. Méd., Strasbourg, 1931.
3. Anderson (T. F.) & Stanley (W. M.). — *J. biol. Chem.*, 1941, **139**, 339.
4. Arrhenius (S.) & Madsen (T.). — *Z. phys. Chem.*, 1903, **44**, 6.
5. Avery (O. T.) & Goebel (W. F.). — *J. exp. Med.*, 1933, **58**, 731.
6. Banks (T. E.), Francis (G. E.), Mulligan (W.) & Wormall (A.). — *Nature*, 1950, **165**, 111; *Biochem. J.*, 1951, **48**, 180 et 371.
7. Boivin (A.), Mesrobeanu (I.) & Mesrobeanu (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 307.
8. Bolton (E. T.), Leone (C. A.) & Boyden (A.). — *J. Immunol.*, 1948, **58**, 169.
9. Bordet (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, **13**, 225 et 273.
10. Bordet (J.). — Traité de l'immunité et des maladies infectieuses, 2e édit., 1 vol., 882 p., Masson & Cie, édit., Paris, 1939.
11. Boyd (W. C.). — *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 221.
12. Boyd (W. C.). — *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 401.
13. Boyd (W. C.). — Fundamentals of immunology, 2e édit., 1 vol., 503 p., Interscience, édit., New-York, 1947.
14. Boyden (A.), Bolton (E.) & Gemeroy (D.). — *J. Immunol.*, 1947, **57**, 211.
15. Breinl (F.) & Haurowitz (F.). — *Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem.*, 1930, **192**, 45.
16. Capdejelle (I.). — Recherches sur le mécanisme de la réaction d'agglutination spécifique. Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1954.
17. Castaneda (R.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **73**, 46.
18. Chargaff (E.). — *Adv. Prot. Chem.*, 1944, **1**, 18.
19. Chow (B. F.) & Goebel (W. F.). — *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 179.

20. Cohn (E. J.). — U. S. Patent, 2.390.740 (4-12-45).
21. Coppo (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1307.
22. Danielli (J. F.), Danielli (M.) & Marrack (J. R.). — *Brit. J. exp. Path.*, 1938, **19**, 393.
23. Dean (H. R.). — *Brit. med. J.*, 1916, **2**, 749.
24. Dean (H. R.) & Webb (R. A.). — *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 473.
25. Delage (B.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1438.
26. Delsal (J. L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26**, 99.
27. Delsal (J. L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 122.
28. Delsal (J. L.), Pérez (J. J.) & Laporte (R.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1950, **32**, 219.
29. Dervichian (D.). — *J. Chim. Phys.*, 1941, **38**, 59.
30. Dervichian (D.). — *Disc. Faraday Soc.*, 1949, **6**, 7.
31. Dervichian (D.) & Grabar (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1942, **214**, 195.
32. Dougherty (T. F.), White (A.) & Chase (J. H.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1944, **56**, 28; voir aussi Dougherty (T. F.), Chase (J. H.) & White (A.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1945, **58**, 135.
33. Dulière (W. L.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 770.
34. Eagle (H.). — *J. exp. Med.*, 1938, **67**, 495.
35. Eggerth (A. H.). — *J. Immunol.*, 1941, **42**, 199; 1942, **45**, 303.
36. Ehrich (W. E.) & Harris (T. N.). — *Science*, 1945, **101**, 28.
37. Ehrlich (P.). — Collected studies on immunity, 1 vol., XI-586 p., John Wiley & sons, édit., New-York, 1906.
38. Eisen (H. N.) & Karush (F.). — *J. Allergy*, 1949, **20**, 393.
39. Fagraeus (A. K.). — *Nature*, 1947, **159**, 499.
40. Faure (F.). — Ninhydrine et réaction de précipitation antigène-anticorps. Thèse Doct. Univ. (Sc.), Bordeaux, 1953.
41. Faure (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, **69**, 334.
42. Flössner (O.) & Kutscher (F.). — *Münch. med. Wochschr.*, 1924, **71**, 576.
43. Ghosch (B. V.), Chandhuri (N. K. R.) & Kundu (M. C.). — *Ann. Biochem. exp. Med.*, 1941, **1**, 175.
44. Gitlin (D.) & Edelhoch (H.). — *J. Immunol.*, 1951, **66**, 67; voir aussi Gitlin (D.). — Light scattering and ultracentrifugation methods in studies of precipitin systems and their application to human metabolism; *in* Cole (W. H.). — Serological approaches to studies of protein structure and metabolism, 1 vol., 97 p., Rutgers University Press, édit., New-Jersey, 1954, p. 23.
45. Goldberg (R. J.) & Campbell (D. H.). — *J. Immunol.*, 1951, **66**, 79.
46. Gorter (E.) & Hermans (J.). — *Proc. kon. ned. Akad. Wet.*, 1942, **45**, 804 et 808.
47. Hagihara (F.). — *J. pharm. Soc. Jap.*, 1954, **74**, 999.

48. Hardy (W. B.) & Gardiner (S.). — *J. Physiol.*, 1910, **40**, LXVIII.
49. Hartley (P.). — *Brit. J. exp. Path.*, 1925, **6**, 180.
50. Haurowitz (F.), Crampton (C. F.) & Sowinski (R.). — *Fed. Proc.*, 1951, **10**, 560.
51. Haurowitz (F.) & Ettili (L.). — *Fed. Proc.*, 1948, **8**, 404.
52. Heidelberger (M.). — *Bact. Rev.*, 1939, **3**, 49.
53. Heidelberger (M.). — The precipitin reaction and the studies of native and denatured proteins and derivatives; *in* Cole (W. H.). — Serological approaches to studies of protein structure and metabolism, 1 vol., 97 p., Rutgers University Press, édit., New-Jersey, 1954, p. 10.
54. Heidelberger (M.) & Avery (O. T.). — *J. exp. Med.*, 1923, **38**, 73; 1924, **40**, 301.
55. Heidelberger (M.) & Kendall (F. E.). — *J. exp. Med.*, 1931, **53**, 625.
56. Heidelberger (M.), Kendall (F. E.) & Sherp (H. W.). — *J. exp. Med.*, 1936, **64**, 559.
57. Heidelberger (M.), Krueger (R. C.) & Deutsch (H. F.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **34**, 146.
58. Heidelberger (M.) & Pedersen (K.). — *J. exp. Med.*, 1937, **65**, 393.
59. Heidelberger (M.), Treffers (H. P.) & Mayer (M.). — *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 271.
60. Hewitt (F.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 216.
61. Hooker (S. B.) & Boyd (W. C.). — *J. Immunol.*, 1932, **23**, 465.
62. Hooker (S. B.) & Boyd (W. C.). — *J. Immunol.*, 1937, **33**, 337.
63. Hooker (S. B.) & Boyd (W. C.). — *J. Immunol.*, 1941, **42**, 419.
64. Horsfall (F. L. Jr) & Goodner (K.). — *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 485.
65. Horsfall (F. L. Jr) & Goodner (K.). — *J. exp. Med.*, 1936, **64**, 583.
66. Ivanovics (G.). — *Z. Immunitätsf.*, 1940, **97**, 402.
67. Kabat (E. A.) & Mayer (M.). — Experimental immunochemistry, 1 vol., 568 p., Thomas, édit., Springfield, 1947.
68. Katsura (T.). — *Jap. J. exp. Med.*, 1950, **20**, 413; 1951, **21**, 243.
69. Kleczkowski (A.). — *Brit. J. exp. Path.*, 1940, **21**, 1.
70. Kraus (R.). — *Wien. klin. Wochschr.*, 1897, **10**, 431 et 736.
71. Krueger (R. C.) & Heidelberger (M.). — *J. exp. Med.*, 1950, **92**, 383.
72. Kumagawa (M.) & Suto (K.). — *Biochem. Z.*, 1908, **8**, 213, 250, 340 et 347.

73. Landsteiner (K.). — The specificity of serological reactions, revised edit., 1 vol., 310 p., Harvard University Press, édit., Cambridge, 1946.
74. Lecomte du Noüy (P.). — *Ergebn. Hyg. Bakt. Immun. exp. Therap.*, 1934, **15,** 323.
75. Lecomte du Noüy (P.) & Hamon (V.). — *Ann. Inst. Pasteur,* 1936, **56,** 359.
76. Levine (P.) & Gilmere (E. L.). — *Science,* 1945, **101,** 411.
77. Linderström-Lang (K.) & Schmidt (S.). — *C. R. Lab. Carlsberg,* 1930, **18,** n° 3, 1.
78. Loiseleur (J.). — Immunité artificielle et structure des protéines; *in* Machebœuf (M.) & Loiseleur (J.). — Réactivité des composés biologiques, conséquence de leur structure, 1 vol., 55 p., Hermann & C^ie^, édit., Paris, 1942, p. 33.
79. Loiseleur (J.). — *C. R. Acad. Sc.,* 1946, **222,** 978.
80. Loiseleur (J.). — *Ann. Inst. Pasteur,* 1950, **78,** 1 et 151.
81. Loiseleur (J.) & Lévy (M.). — *Ann. Inst. Pasteur,* 1947, **73,** 116.
82. Long (J. H.) & Gephart (F.). — *J. Am. chem. Soc.,* 1908, **30,** 881 et 1312.
83. Lumière (A.) & Meyer (P.). — *C. R. Soc. Biol.,* 1934, **115,** 1698.
84. Mc Farlane (A. S.). — *Nature,* 1942, **149,** 439.
85. Machebœuf (M.). — Recherches sur les stérols, les lipides et les protéides du sérum et du plasma sanguin. Thèse Doct. Sc., Paris, 1928.
86. Machebœuf (M.). — Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique. 1 vol., 78 p. Hermann & C^ie^, édit., Paris, 1936.
87. Machebœuf (M.). — *Exp. ann. Biochim. méd.,* 1939, **2,** 117.
88. Machebœuf (M.). — *Exp. ann. Biochim. méd.,* 1945, **5,** 71.
89. Machebœuf (M.). — *Exp. ann. Biochim. méd.,* 1948, **8,** 245.
90. Machebœuf (M.) & Faure (M.). — *Exp. ann. Biochim. méd.,* 1942, **3,** 134.
91. Machebœuf (M.), Lévy (G.) & Faure (M.). — *C. R. Acad. Sc.,* 1937, **204,** 1843.
92. Machebœuf (M.) & Rebeyrotte (P.). — *Bull. Soc. Chim. biol.,* 1944, **26,** 475.
93. Machebœuf (M.), Rebeyrotte (P.), Dubert (J. M.) & Brunerie (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.,* 1953, **35,** 334.
94. Machebœuf (M.) & Sandor (G.). — *C. R. Acad. Sc.,* 1932, **194,** 1102; *Bull. Soc. Chim. biol.,* 1932, **14,** 1168.
95. Machebœuf (M.) & Tayeau (F.). — *C. R. Acad. Sc.,* 1938, **206,** 860; *C. R. Soc. Biol.,* 1938, **129,** 1181.
96. Machebœuf (M.) & Tayeau (F.). — *C. R. Soc. Biol.,* 1938, **129,** 1184.

97. Marrack (J. R.). — The chemistry of antigens and antibodies, 2e édit., 1 vol., 194 p., His Majesty's stationery office, édit., London, 1938.
98. Marrack (J. R.). — Medical Research Council, Special report, 1938, **230,** 149.
99. Marrack (J. R.) & Hoch, cités par Marrack (J. R.). — 1st Intern. Congr. Biochem., Cambridge, 1949; abstr., p. 449.
100. Marrack (J. R.), *in* Sumner (J. B.) & Myrbäck (K.). — The enzymes. Chemistry and mechanism of action, 2 vol., 1361 et 1440 p., Academic Press Inc., édit., New-York, 1950.
101. Morales (M. F.), Botts (J.) & Hill (T. L.). — *J. Am. chem. Soc.*, 1948, **70,** 2339.
102. Morgan (W. T. J.). — *Biochem. J.*, 1937, **31,** 2003.
103. Neuzil (E.). — Les réactions de précipitation antigène-anticorps. Etude théorique. Recherches expérimentales. Thèse Doct. Méd., Bordeaux, 1948.
104. Neuzil (E.) & Marquevielle (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143,** 1185.
105. Neuzil (E.), Marquevielle (J.) & Tayeau (F.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1949, **230,** 489.
106. Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141,** 186 et 188.
107. Northrop (J. H.). — *Science*, 1941, **93,** 92.
108. Northrop (J. H.) & de Kruif (P. H.). — *J. gen. Physiol.*, 1921-1922, **4,** 639.
109. Obermayer (F.) & Pick (E. P.). — *Wien. klin. Wochschr.*, 1904, **17,** 265.
110. Oikawa (K.). — *Jap. med. J.*, 1948, **1,** 494.
111. Oikawa (K.). — *Jap. med. J.*, 1949, **2,** 63.
112. Oikawa (K.). — *Jap. med. J.*, 1950, **3,** 179.
113. Orlans (E.). — *Brit. J. exp. Path.*, 1952, **33,** 451.
114. Pappenheimer (A. M. Jr). — *J. exp. Med.*, 1940, **71,** 263.
115. Pappenheimer (A. M. Jr), Lundgren (H. P.) & Williams (J. W.). — *J. Am. chem. Soc.*, 1939, **61,** 533; *J. exp. Med.*, 1940, **71,** 247.
116. Pauling (L.). — *J. Am. chem. Soc.*, 1940, **62,** 2640; voir aussi Pauling (L.) & Campbell (D. H.). — *Science*, 1942, **95,** 440.
117. Pauling (L.), Pressman (D.) & Campbell (D. H.). — *Science*, 1943, **98,** 263; *J. Am. chem. Soc.*, 1944, **66,** 330.
118. Pauling (L.), Pressman (D.), Campbell (D. H.) & Ikeda (C.). — *J. Am. chem. Soc.*, 1942, **64,** 3003.
119. Pauling (L.), Pressman (D.), Campbell (D. H.), Ikeda (C.) & Ikawa (M.). — *J. Am. chem. Soc.*, 1942, **64,** 2994.
120. Pauling (L.), Pressman (D.) & Ikeda (C.). — *J. Am. chem. Soc.*, 1942, **64,** 3010.

121. Pautrizel (R.). — Recherches sur la genèse et la réactivité des anticorps. Thèse Doct. Sc., Bordeaux, 1948.
122. Pautrizel (R.) & Tayeau (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142,** 221.
123. Pedersen (K.). — Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions, 1 vol., 178 p., Alqvist and Wiksells, édit., Upsala, 1945.
124. Piettre (M.) & Vila (A.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1920, **170,** 1466.
125. Polonovski (J.). — Action des amines quaternaires à chaîne grasse sur les protéines, les lipides et les cénapses lipoprotéiques. Thèse Doct. Sc., Paris, 1950.
126. Polonovski (J.) & Machebœuf (M.). — *Ann. Inst. Pasteur,* 1948, **74,** 196.
127. Pope (C. G.). — *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20,** 132 et 201.
128. Porges (O.) & Spiro (K.). — *Beit. chem. Physiol. Path.*, 1903, **3,** 277.
129. Pressman (D.), Bryden (J. H.) & Pauling (L.). — *J. Am. chem. Soc.*, 1948, **70,** 1352.
130. Pressman (D.) & Eisen (H.). — *J. Immunol.*, 1950, **64,** 273.
131. Ramon (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86,** 711.
132. Rothen (A.). — *Science,* 1945, **102,** 446; *J. biol. Chem.*, 1947, **168,** 75; *J. Am. chem. Soc.*, 1948, **70,** 2732.
133. Rouhi (A.), Blass (J.) & Polonovski (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36,** 1417.
134. Saias (E.). — Contribution à l'étude des associations lipoprotéidiques en couches moléculaires à la surface de solutions aqueuses. Thèse Doct. Pharm., Paris, 1942.
135. Sandor (G.) & Goldie (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126,** 295; 1938, **127,** 942; 1938, **129,** 391 et 741.
136. Schramm (G.) & Friedrich-Freksa (H.). — *Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem.*, 1941, **270,** 233.
137. Schwert (G. W.), Putnam (F. W.) & Briggs (D. A.). — *Arch. Biochem.*, 1944, **4,** 371.
138. Singer (S. T.) & Campbell (D. H.). — *J. Am. chem. Soc.*, 1952, **74,** 1794.
139. Sœrensen (S. P. L.). — *C. R. Lab. Carlsberg,* 1930, **18,** 1.
140. Sœrensen (S. P. L.). — *C. R. Lab. Carlsberg,* 1930, **18,** 124.
141. Spalding (D. H.) & Metcalf (T. G.). — *J. Bacteriol.*, 1954, **68,** 160.
142. Tayeau (F.). — Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides aux protéides dans le sérum sanguin. Thèse Doct. Sc., Bordeaux, 1939.
143. Tayeau (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130,** 1029.
144. Tayeau (F.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1941, **212,** 575.
145. Tayeau (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138,** 700.

146. Tayeau (F.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26,** 287.
147. Tayeau (F.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26,** 293.
148. Tayeau (F.). — *Disc. Faraday Soc.*, 1949, **6,** general discussion, 116.
149. Tayeau (F.). — *Ann. Biol. clin.*, 1950, **8,** 602.
150. Tayeau (F.). — *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1952, **14,** 129.
151. Tayeau (F.). — *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1955, **17,** 213.
152. Tayeau (F.) & Breton (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141,** 756; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29,** 680.
153. Tayeau (F.), Dulong de Rosnay (C.), Martin-Dupont (C.) & Loste (H.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1953, **130,** 397.
154. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — *Disc. Faraday Soc.*, 1949, **6,** 106; voir aussi Tayeau (F.) et Faure (F.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35,** 1325.
155. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — 1st Intern. Congr. Biochem., Cambridge, 1949; abstr., p. 455.
156. Tayeau (F.) & Marquevielle (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1952, **234,** 901.
157. Tayeau (F.), Marquevielle (J.) & Marquevielle (S.). — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1954, **92,** 231 et 239.
158. Tayeau (F.) & Neuzil (E.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140,** 509.
159. Tayeau (F.) & Neuzil (E.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1953, **130,** 313.
160. Tayeau (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141,** 191.
161. Thudicum, cité par Machebœuf (86).
162. Tiselius (A.) & Kabat (E. A.). — *J. exp. Med.*, 1939, **69,** 119.
163. Topley (W. W. C.), Wilson (J.) & Duncan (J. T.). — *Brit. J. exp. Path.*, 1935, **16,** 116.
164. Trensz (F.). — *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1935, **13,** 513.
165. Verwey (W. F.). — *J. exp. Med.*, 1940, **71,** 635.
166. Villaret (M.), Justin-Besançon & Drilhon, cités par Fauvert (D.), *in* Le cholestérol estérifié, test d'insuffisance cellulaire du foie. Thèse Doct. Méd., Paris, 1942.
167. Viscontini (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1944, **219,** 222.
168. Wiener (A. S.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1944, **56,** 173.
169. Wiener (A. S.) & Herman (M.). — *J. Immunol.*, 1939, **36,** 255.
170. Winkler (A.) & Westphal (O.). — *Z. Immunitätsf.*, 1944, **105,** 154.
171. Wurmser (R.) & Filitti-Wurmser (S.). — *Biochim. biophys. Acta*, 1950, **4,** 238.
172. Young (E. G.). — *Proc. Roy. Soc.*, 1922, série B, **93,** 15.
173. Zinsser (H.), Enders (J. F.) & Fothergill (L. D.). — Immunity principles and application in medicine and public health, 5 th edit. of Resistance to infectious diseases, 1 vol., 801 p., The Mac Millan C°, édit., New-York, 1939.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE

Etude historique

CHAPITRE PREMIER. — QUELQUES BREFS RAPPELS SUR LES NOTIONS CLASSIQUES D'IMMUNOCHIMIE 7

I. — Les antigènes 8

II. — Les anticorps 11

III. — La réaction de précipitation antigène-anticorps.. 12

IV. — Théories sur le mode d'union entre l'antigène et l'anticorps 16

CHAPITRE II. — L'ÉTAT DES LIPIDES DANS LE SÉRUM SANGUIN.. 23

I. — Les cénapses lipido-protéidiques 23

II. — Conceptions récentes sur les associations lipido-protéidiques 25

DEUXIÈME PARTIE

Recherches expérimentales

CHAPITRE PREMIER. — LES LIPIDES SÉRIQUES ET LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE 31

I. — Choix d'une méthode pour la délipidation des sérums immuns 34

II. — Etude de l'influence exercée par la délipidation sur la réaction de précipitation 39

III. — Influence exercée sur la vitesse de floculation par l'addition d'immunsérum homologue délipidé préalablement neutralisé par l'antigène 46

IV. — Influence exercée par le moment d'addition de l'immunsérum délipidé à un système floculant.. 53

A. — Addition d'immunsérum délipidé..... 54

B. — Addition d'immunsérum délipidé préalablement neutralisé 55

Pages

V. — Influence des différentes fractions immunes délipidées 58

A. — Addition de fractions immunes homologues 58

B. — Addition de fractions non immunes ou hétérologues 64

VI. — Essais de restitution des propriétés floculantes aux immunsérums délipidés 70

A. — Centrifugation 70

B. — Addition de polymères hydrosolubles.. 75

Conclusions du chapitre premier 78

CHAPITRE II. — MISE EN ÉVIDENCE DES COMPLEXES ANTIGÈNE-ANTICORPS DÉLIPIDÉ 80

I. — Analyse capillaire sur papier 80

II. — Electrophorèse sur papier 82

III. — Diffusion latérale de la lumière 84

Conclusions du chapitre II 92

CHAPITRE III. — APPLICATION DES RECHERCHES PRÉCÉDENTES A LA DÉMONSTRATION DU CARACTÈRE SPÉCIFIQUE DE LA SECONDE PHASE DANS LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION 93

I. — Etude mettant en œuvre des systèmes non homologues mais à antigène commun 95

II. — Etude mettant en œuvre l'iode radioactif 101

Conclusions du chapitre III 104

CHAPITRE IV. — CONFIRMATION DU RÔLE JOUÉ PAR LES LIPIDES DANS LE PHÉNOMÈNE DE FLOCULATION : ÉTUDE DE L'ACTION DE QUELQUES COMPOSÉS SUR LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS.. 105

I. — Etude, en lumière diffusée, du mode d'action de certains composés actifs sur la réaction antigène-anticorps 107

II. — Etude de l'action de diverses substances oxydantes ou réductrices sur la réaction de précipitation spécifique 110

Conclusions du chapitre IV 114

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 115

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 119

Bordeaux. — Imp. E. DROUILLARD, place de la Victoire, 3.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

BIOCHIMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA PIGMENTATION CHEZ LES ARTHROPODES

Vu et approuvé,
Bordeaux, le 26 Mars 1955
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Signé : G. BRUS.

Vu et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 28 Mars 1955
Le Recteur de l'Académie de Bordeaux,
Signé : E. DELAGE.